

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/53

C07K 14/555

C07K 1/107 A61K 47/48

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95191454.5

[45] 授权公告日 2001 年 9 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1071760C

[22] 申请日 1995. 2. 8

[21] 申请号 95191454.5

[30] 优先权

[32] 1994. 10. 12 [33] US [31] 08/321,510

[86] 国际申请 PCT/US95/01729 1995. 2. 8

[87] 国际公布 WO96/11953 英 1996. 4. 25

[85] 进入国家阶段日期 1996. 8. 1

[73] 专利权人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 O·B·金斯勒 N·E·加布里尔

C·E·发拉 R·B·迪普林斯

[56] 参考文献

EP0098110 1984. 1. 11 A61K47/00

WO9004606 1990. 3. 3 C07K17/08

审查员 黄 赤

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 王景朝

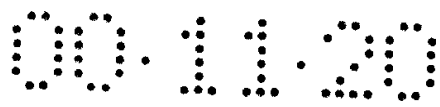
权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图页数 15 页

[54] 发明名称 N-端化学修饰的蛋白质组合物及方法

[57] 摘要

本文提供了涉及给蛋白质附着水溶性多聚物的方法及组合物。提供了用于 N 端修饰蛋白质或其类似物的新方法及新得的组合物,包括新 N 端化学修饰的 G-CSF 组合物和相关制备方法。提供了化学修饰的共有干扰素。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. N-末端单聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物的基本上均一制品, 任选存在于药用稀释剂、载体或佐剂中。
- 5 2. 权利要求 1 的制品, 其中所说的聚乙二醇具有在 2 kDa 到 100 kDa 之间的分子量。
3. 权利要求 2 的制品, 其中所说的聚乙二醇具有在 6 kDa 到 25kDa 之间的分子量。
- 10 4. 权利要求 1 至 3 中任一项的制品, 其中所说的制品由至少 90% 的 N-末端单聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物及至多 10% 的未发生聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物组成。
5. 权利要求 4 的制品, 其中所说的制品由至少 95% 的 N-末端单聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物及至多 5% 的未发生聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物组成。
- 15 6. 权利要求 1 至 5 中任一项的制品, 其中所述 G-CSF 具有与 SEQ ID No: 1 一致的序列。
7. N-末端单聚乙二醇化的 G-CSF 的基本上均一的制品, 其中:
(a)所说的 G-CSF 具有与 SEQ ID No.1 一致的氨基酸序列; (b)所说的 G-CSF 用分子量为 12 kDa 的聚乙二醇部分单聚乙二醇化。
- 20 8. 一种 G-CSF 或其类似物的混合的制品, 其含有与多聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物制品混合的 N-末端单聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物制品, 其中单聚乙二醇化的 G-CSF 或其类似物制品的比例是预定的。
9. 权利要求 8 的混合的制品, 其中 N-末端单聚乙二醇化的 G-CSF 制品选自权利要求 1 至 7 中的那些。
- 25 10. 一种药用组合物, 其含有有效量的选自权利要求 1-9 中任一项的制品, 和药用稀释剂、佐剂或载体。
11. 权利要求 1 至 9 中任一项的制品在制备用于治疗以造血或免疫

功能减退为特征的疾病的药物中的应用。

12. 权利要求 11 的应用，其中疾病是由化疗、放疗、感染性疾病、严重慢性嗜中性粒细胞减少症或白血病引起的。

5 13. 制备 N 末端单聚乙二醇化 G-CSF 或其类似物的方法，其包括如下步骤：

a) 在还原性烷基化反应条件下，在足够酸性以选择性地激活 α -氨基的 pH 值下，在含水介质中将在 N 末端具有 α -氨基的 G-CSF 或其类似物与具有单个醛基的水溶性聚乙二醇反应，

b) 任选地从反应混合物中分离 N 末端单聚乙二醇化的产物。

10 14. 权利要求 13 的方法，其中所说的聚乙二醇具有在 2 kDa 到 100 kDa 之间的分子量。

15. 权利要求 14 的方法，其中所说的聚乙二醇具有在 6 kDa 到 25kDa 之间的分子量。

15 16. 权利要求 13 至 15 中任一项的方法，其中所说的聚乙二醇是甲氧聚乙二醇醚。

17. 权利要求 13 至 16 中任一项的方法，其中在还原性烷基化中所用的还原剂是硼氢化钠、氰基硼氢钠。

18. 权利要求 13 至 17 中任一项的方法，其中 G-CSF 或其类似物是非糖基化的。

20 19. 权利要求 13 至 18 中任一项的方法，其中 G-CSF 或其类似物在 N 末端第 -1 位有甲硫氨酸部分。

20. 权利要求 13 至 19 中任一项的方法，其中分离步骤(b)包括纯化。

21. 权利要求 20 的方法，其中纯化包括反应混合物的离子交换色谱和分子筛层析。

25

说明书

N - 端化学修饰的蛋白质组合物及方法

发明领域

本发明总的来说是涉及蛋白质修饰领域，而且，更具体地说是涉及对蛋白质及其类似物附着水溶性多聚物的领域（本文所用的术语“蛋白质”与“多肽”或“肽”这些术语，如未作其它说明均指同一意思）。本发明还涉及用于 N 端修饰蛋白质或其类似物的新方法和所得的组合物。另一方面，本发明涉及新 N 端化学修饰的 G - CSF 组合物和有关制备方法。本发明还涉及化学修饰的共有的干扰素。

10 发明背景

目前，治疗用蛋白质之所以能以适当的形式及充足的数量获得主要是由于重组 DNA 技术的进展。重组蛋白质的可用性导致蛋白质配方及化学修饰方面的进展。这种化学修饰的目的之一就是蛋白质保护。化学附着可有效地阻止蛋白水解酶与蛋白质骨架本身的接触，从而阻止了蛋白质的降解。其它的优势包括在特定环境条件下，增加治疗蛋白质的稳定性及循环时间并且减小其免疫原性。描述蛋白质修饰及融合蛋白质的综述性文章是：Francis Focus on Growth Factors, 3 : 4 - 10 (1992年5月)由 Mediscript, Morntview Court, Friern Barnet Land, London N20, OLD, UK 出版)。

20 聚乙二醇（“PEG”）就是一种这类化学修饰部分，它用来制备治疗用蛋白质产品（动词“PEG化”（pegylate）意指附着至少一个 PEG 分子）。例如 Adagan 即为腺苷脱氨酶的 PEG 修饰形式，已被获准用于治疗严重复合型免疫缺陷疾病；PEG 化的起氧歧化酶已进入治疗头部损伤的临床试用阶段；PEG 化的 α - 干扰素已在治疗肝炎的 I 期临床试验中进行了测试；另据报导 PEG 化的葡萄糖脑苷脂酶和 PEG 化的血红蛋白也已进入临床前试验阶段。附着聚乙二醇对蛋白水解的保护作用已见报道（Sada, 等 J. Fermentation Bioengineering 71 : 137 - 139, 1991），附着特定的聚乙二醇部分的方法参见美国专利 No. 4, 179, 337, Davis et al., “无免疫原性多肽”，于 1979 年 12 月 18 日公布。以及美国专利 No. 4, 002, 531, Royer, “聚乙二醇对酶的修饰及其生产的产品”，1977 年 1 月 11 日公布。如果想对此领域有更全面的了解，可参见 Abuchowski 等 “Enzymes as Drugs”（J. S. Holcerberg

and J. Roberts, eds. pp. 367 - 383 页 (1981)) .

已使用的其它水溶性多聚物如乙二醇、丙二醇共聚物, 羧甲基纤维素, 葡聚糖, 聚乙烯醇, 聚乙烯吡咯烷酮, 聚 - 1,3 - 二氧戊环 (poly - 1,3 - dioxolane), 聚 - 1,3,6 - 三噁烷, 乙烯马来酸酐共聚物, 5 多聚氨基酸 (或者是单一聚体或者是随机共聚体) .

对于聚乙二醇分子来说, 可通过多种方法将其加到蛋白质上. 总的来说, 聚乙二醇分子是通过一个在蛋白质分子上发现的反应基团而联到蛋白质分子上的. 氨基, 如赖氨酸残基上的或 N - 末端上的氨基通常用于这类附着. 例如, Royer (美国专利号 4, 002, 531, 见上述) 认为 10 可利用还原性烷基化反应将聚乙二醇分子附着到酶上. Wright 于 1993 年 4 月 28 日公开的 EP 0 539 167, “ Peg Imidates and Protein Derivates Thereof ” 中认为带有自由氨基的肽及有机复合物可被 PEG 的直接衍生物或有关的水溶性有机多聚体所修饰. Shaw 在 1990 年 2 月 27 日公开的美国专利号 4, 904, 584 中涉及修饰蛋白质中用于通过反应 15 性氨基基团附着聚乙二醇分子的赖氨酸残基的数目.

“ G - CSF ”, 粒细胞集落刺激因子即为一种经过化学修饰的具体治疗用蛋白质. G - CSF 诱导嗜中性粒细胞的快速增殖并释放到血液中, 从而在抗感染中提供治疗效应.

欧洲专利公开 EP 0 401 384 于 1990 年 12 月 12 日公开的题为 “ 化 20 学修饰的粒细胞集落刺激因子 ” 中描述了用于制备附着有聚乙二醇分子的 G - CSF 的材料和方法.

1992 年 3 月 4 日公开的题为 “ 连续性释放包含一个多肽分子共价结合上一水溶性多聚体的药用组合物 ” 的 EP 0 473 268 中报道了修饰的 G - CSF 及其类似物, 描述了各种 G - CSF 及其共价结合上一水溶性颗粒 25 多聚体如聚乙二醇所产生的衍生物的使用.

于 1989 年 10 月 4 日公开的 EP 0 335 423 报道了一种修饰的具有人类粒细胞集落刺激因子活性的多肽.

另一个例子是 PGE 化的 IL - 6, 在题为 “ 修饰的 hIL - 6 ” (参见共同未决的 U. S. S. N. 07/632, 070) 的 EP 0 442 724 中公开了将聚 30 乙二醇分子附着到 IL - 6 分子上.

于 1985 年 9 月 11 日公开的 EP 0 154 316 报道了一淋巴细胞活素 (Lymphokine) 与一聚乙二醇的醛发生反应.

许多给蛋白质分子附着多聚物的方法涉及使用某一部分作为联接基团。然而这些部分往往具有抗原性。可进行一种不涉及联接基团的 tresyl chloride 法,但由于 tresyl chloride 的使用会产生毒副产品,故很难用该方法生产治疗用产品。参见 Francis 等: 蛋白质药物的稳定性: 体内的降解途径及蛋白质稳定化的策略(Eds. Ahern., T. and Manning, M. C.) (plenum, New York, 1991)。同时还可参见 Delgado 等., “通过 Tresyl chloride 激活偶联 PEG 到蛋白质在免疫亲合细胞制备中的应用”。 Fisher 等 eds., 水相系统分离在细胞生物学及生物技术中的应用, Plenum Press, N. Y. N. Y., 1989 pp. 211 - 213。

10 Chamow 等 (Bioconjugate Chem. 5 : 133 - 140 (1994)) 报道了 CD4 免疫吸附素 (immanoadhesin) 通过与单甲氧基多聚乙二醇醛发生还原性烷化作用进行修饰。作者报道 50 % 的 CD4 - Ig 在 PEG 化反应程度可控的条件下进行 MePEG 修饰。出处同上, 见 137 页。作者还报道了在体外, 修饰的 CD4 - Ig 结合 (对蛋白 gp120) 的能力与其 MePEG 化的程度呈负相关。 出处同上, 同样也可参见 Rose et al., 15 Bioconjugate Chemistry 2 : 154 - 159 (1991) , 文中报道了连接基团卡巴肼 (carbohydrazide) 选择性地附着到蛋白质底物(胰岛素)的 C - 末端羧基上。

然而, 在整个领域内或涉及特定蛋白质的领域内还没有一种方法能够 20 让水溶性多聚物选择性地附着到蛋白质如 G - CSF 的 N - 末端上。更有甚者, 目前存在的方法在任何反应基团上提供非选择性附着反应, 无论这些基团是在蛋白质内 (例如, 赖氨酸侧链基团) , 还是在 N - 末端上。这将会导致产物的不均一。例如, PEG 化的 G - CSF 分子, 有些分子中含有数目不同于其它分子的聚乙二醇部分。比如一个含 5 个赖氨酸残基的分子在上述反应中可能会形成一种不均一混合物, 一些分子含有 6 25 个聚乙二醇分子, 一些分子中具有 5 个, 一些分子中具有 4 个, 一些分子中具有 3 个, 一些分子中具有 2 个, 以及具有 1 个甚至一个聚乙二醇分子也没有。并且在带有一些聚乙二醇的分子中, 聚乙二醇分子在不同的分子中可能不会附着于相同的位置。

30 以上这些都是开发治疗用 PEG 化蛋白质产品不利因素。开发这类药物时, 产品生物活性的可预见性显得分外重要。例如, 在超氧化物歧化酶非选择性地与聚乙二醇分子结合的情况下, 一部分修饰的酶完全丧

失活性 (P. McGoff et al. Chem. Pharm. Bull. 36 : 3079 - 3091 (1988))。如果这些治疗性蛋白质在组合物中各批量间有区别, 人们将无法对其生物活性进行预测。不同位点结合的聚乙二醇分子稳定性不同, 这一情况可能导致这些分子从蛋白质中解离出来。当然, 如果
5 这些分子是随机附着而因此随机解离, 那么治疗用蛋白质的药物动力学就不可能准确预测。从消费者的角度考虑, 不同批量的循环时间不尽相同, 因此剂量上也可能是不准确的。从生产者角度考虑, 获准进入市场的
10 治疗用蛋白质的保存将增添麻烦。此外, 上述方法没有一个提供无连接部分 (蛋白质和多聚体之间) 的选择性 N - 末端化学修饰。如果合用连接部分, 由于可能的抗原性, 可能产生不利影响。

因此, 仍需要能选择性 N 端化学修饰蛋白质及其类似物, 包括 G - CSF 及共有干扰素 (以下就以这两种化学修饰的蛋白质为例加以说明) 的方法本发明从诸多方面阐述了这一需要。

本发明概述

15 本发明涉及 N - 端化学修饰的蛋白质的基本上均一的制品及其所用的方法。出乎意料的是 N - 末端化学修饰的 G - CSF 显示出在该分子的另一位点上含一个化学修饰的其它 G - CSF 各类所未发现的在稳定性方面的优势。更出人意料的是在用于制备 N - 末端化学修饰的 G - CSF 的本方法中, 发现使用还原性烷基化反应能够提供选择性地修饰 N - 末端
20 的条件, 并且该方法可广泛地应用于其它蛋白质 (或其类似物) 以及 G - CSF。令人惊奇的是, 利用还原性烷基化反应, 其终产物 - 以胺键与水溶性多聚体结合的蛋白质, 要比具有酰胺键 (amide linkage) 的相同多聚物 / 蛋白质连接物稳定得多。另外一个这样修饰的蛋白质 (如下就以此为实施例加以描述) 是共有干扰素 (consensus interferon)。
25 因此, 正如上面所要详述的, 本发明具有涉及化学修饰蛋白质 (或其类似物) 以及特定蛋白质的特殊修饰的诸多方面的内容。

一方面, 本发明涉及 N - 末端化学修饰的 G - CSF (或其类似物) 的基本上均一的制品及有关方法。在下面实施例中说明了 N - 末端单个 PEG 化的 mono - PEG 的 G - CSF 要较其它类型的单个 PEG 化的 G - CSF
30 更稳定。另外, 由于 G - CSF 分子的 N - 末端在反应过程中较易与聚乙二醇分子接近, N - 末端 PEG 化比例较高, 因此该方法操作起来比较具有优势。

本发明还涉及一种还原性烷基化反应类型。该反应可选择性地激活蛋白质或其类似物 N - 末端残基的氨基基团，从而使水溶性多聚体部分选择性附着到 N 端。这样提供了多聚体/蛋白质结合分子的基本上均一的制品以及（如果应用聚乙二醇的话）具有聚乙二醇部分直接偶联到蛋白质部分上的 PEG 化蛋白质分子的制品。下面描述了用于 G - CSF 及共有干扰素的这一方法，这些内容提供了本发明的其它方面。

附图简述

图 1A 为一 PEG 化的 G - CSF 离子交换色谱峰的色谱图复制品。

图 1B 各种类型单 PEG 化 G - CSF 的 SDS - PAGE 图。

10 图 2：线 A 为重组人类甲二磺酰 G - CSF 标准样的 SEC - HPLC 图；线 B 为 SCM - PEG - GCSF 反应混合物；线 C 为 N - 末端 PEG 化的 G - CSF；线 D 为 35 赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF；线 E 为赖氨酸 41 单个 PEG 化的 G - CSF。

15 图 3A、3B 及 3C 为经内蛋白酶（endoproteinase）SV8 肽酶切后的 HPLC 图，3A 为 N - 末端 PEG 化的 G - CSF；3B 为 35 赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF；3C 为赖氨酸 41 单个 PEG 化的 G - CSF。

图 4 是一条形图，图示在体外，单个 PEG 化的 G - CSF 种类与未 PEG 化的标准样生物活性的比较。

20 图 5A 及 5B 显示了在体内单个 PEG 化的 G - CSF 衍生物生物活性的分析结果，图 5A 显示仓鼠经皮下注射 N - 末端 PEG 化的 G - CSF，35 赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF 或赖氨酸 41 单个 PEG 化的 G - CSF 后白血球计数的平均值，图 5B 显示经单次皮下注射上述各种单个 PEG 化的 G - CSF 衍生物后曲线下的最终平均白血球数面积。

25 图 6A、6B 及 6C 为研究 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 或 35 赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF 的稳定性所得的 SEC - HPLC 图。图 6A 为在 pH 6.0，4 °C 条件下研究 N - 末端单个 PEG 化的 G - CSF 稳定性的 SEC - HPLC 图，图 6B 为相同条件下 35 赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF 图。图 6C 显示在 pH 6.0 及 4 °C 下进一步对 35 赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF 稳定性研究结果。时间（“T”）表示天。

30 图 7 显示了 rh - G - CSF 与甲氧聚乙二醇醛（MW6kDa）发生还原性烷基化反应的过程中反应混合物的筛析（size exclusion）HPLC 分析结果。

图 8 显示了用 MPEG (也在 MW = 6kDa) N - 羟基琥珀酰酯的反应混合物筛析 (size exclusion) HPLC 分析图。

图 9 为单次皮下注射剂量的单 N - 末端 MPEG - GCSF 接合物 (由 rh - G - CSF 不同分子量的 MPEG 醛经过还原性烷基化反应制得, 其中 MPEG 的分子量为 6 kDa、12kDa 以及 20kDa) 后总的白血球反应情况。

详细描述

本发明涉及 N - 末端化学修饰蛋白质的基本上均一的制品及其所用的方法。

一方面, 本发明涉及 N - 末化学修饰的 G - CSF 的组合物及其所用的方法。

本方法 (用于 N - 末端修饰 G - CSF 以及还原性烷基化反应法) 提供了单聚体/蛋白质连接物的基本上均一的混合物。本文所用的“基本上均一的”意指观察到的每个聚合物/蛋白质连接物分子中均只含一个聚合物部分。制品中也许会包含未反应 (即缺乏聚合物部分) 的蛋白质。在下面的一个实施例中, 通过肽图谱 (peptide mapping) 及 N - 末端测序证实, 制备出的制品中至少含 90 % 的单聚体/蛋白质连接物, 未反应蛋白质含量最多不超过 10 %。优选的是, N - 末端单个 PEG 化物质含量至少应达到制品的 95 % (正如在下面实施例中所述), 最优选的是, N - 末端单个 PEG 化物质占制品的 99 % 或更高。这种单聚体/蛋白质连接物具有生物活性。本文提供的“基本上均一”的 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 制品意指这些制品的均一性足以能够显示出均一制品所具有的优越性, 例如, 易于在临床应用中预测不同批量的药物动力学。

人们可以选择制备聚合物/蛋白质连接物分子混合物, 本文提供的优势在于, 人们可以选择单聚体/蛋白质连接物在混合物中的比例。这样, 如果需要的话, 人们便可以制备出带有不同数目附着的聚合物分子 (比如 2 个、3 个、4 个等等) 的各种蛋白质混合物, 并与利用本发明方法制备出的单聚体/蛋白质连接物结合, 便可得到预定单聚体/蛋白质连接物比例的混合物。

下面提供使用 G - CSF 的实施例, 如上所述, G - CSF 是用于治疗造血障碍的治疗用蛋白质。一般来说, 在本发明实施中有用的 G - CSF 可以从哺乳动物有机体中分离的, 或者作为选择是化学合成方法的产品, 或者是通过原核生物或真核生物宿主表达外源性 DNA 序列而得到的

产品，其中这些 DNA 可从基因组或 cDNA 克隆或通过 DNA 合成得到。合适的原核生物宿主包括各种细菌（如，*E. coli*）；合适的真核生物宿主包括酵母（如 *S. cerevisiae*）及哺乳动物细胞（如：中国仓鼠卵巢细胞，猴细胞）。依据所用的宿主的不同，G - CSF 表达产物可能会被哺乳动物或其它真核细胞中的碳水化合物所糖基化，或非糖基化。G - CSF 表达产物中也可以包括一个起始的甲硫氨酸残基（在第 - 1 位）。虽然优选重组 G - CSF（特别是来自 *E. coli*），本发明预测了使用任意或全部其它生物中 G - CSF 的这类形式的最大商业实用性。

已有报道一些 G - CSF 类似物具有生物学功能，这些分子也可以是化学修饰的，例如，添加上一个或多个聚乙二醇分子。G - CSF 类似物在美国专利 No. 4, 810, 643 中已有报道。具报道有生物活性的其它 G - CSF 类似物的例子有 AU - A - 76380/91，EP 0 459 630，EP 0 272 703，EP 0 473 268 以及 EP 0 335 423 中所描述的那些，虽然文中没提供报道公开的每种类似物的活性。还可参见 AU - A - 10948/92，PCT US 94/00913 以及 EP 0 243 153。

一般来说，本发明中有用的 G - CSF 及其类似物可以通过进行本文提供的化学修饰程序以选择性地修饰 N - 末端 α - 氨基，试验所得产品的所需生物学特征，例如本文提供的生物活性试验来确定。当然，如果需要非人类哺乳动物进行这类治疗，可以使用重组非人类的 G - CSF，如重组鼠、牛及犬等的 G - CSF 产品。例如，参见 PCT WO 9105798 及 PCT WO 8910932。

因此，本发明的另一个方面包括 N - 末端化学修饰的 G - CSF 类似物的组合物。如上所述，G - CSF 类似物可包括具有氨基酸添加、缺失和/或替代（与下面实施例 1 中所述的 G - CSF 氨基酸序列相比较而言）的产物。那些当 N - 末端被 PEG 化时预期发挥功能以选择性刺激中性粒细胞的产生的 G - CSF 类似物是为结合到 G - CSF 受体上并非必要的 N - 末端的类似物，见 Hill et al., PNAS - USA 90 : 5167 - 5171 (1993)；也可参见 PCT US 94/00913。

使用的聚合物分子可选自水溶性多聚体。（对于本文描述的还原性烷基化方法，多聚体应具有单个反应醛基）。选择性聚合物分子应是水溶性的，使其要结合的蛋白质分子在水环境中不会发生沉淀现象，例如生理环境中。从还原性烷基化反应角度考虑，选择的聚合物分子应具有

一个反应醛基，这样就可以根据本发明方法对聚合程度进行控制。多聚体可以是分枝或不分枝的。对于终产物制品的治疗用途，优选的聚合分子应是药用上可接受的。本领域的技术人员应能够根据该聚合物/蛋白质连接物是否在治疗上使用来选择所需的聚合物，如果是在治疗上使用，
5 则应考虑其剂量，循环时间，对蛋白水解的抵抗力以及其它一些因素。对于 G - CSF 来说，可用本文中提供的测试手段加以探知，本领域的技术人员还应针对其它治疗性蛋白质选择合适的测试手段。水溶性多聚体可选自如：上面所列出的（背景部分）各种分子以及葡聚糖或聚（n - 乙烯吡咯烷酮），聚乙二醇，聚丙二醇，聚氧化丙烯/氧化乙烯
10 （polypropylene oxide/ethylene oxide）共聚物，聚氧乙烯化多元醇和聚乙烯醇。

出于下面所述的最优化考虑，聚合物的分子量可以是任意大小，并且可以是带有分枝或不分枝的。对于聚乙二醇来说，最优的分子量是约为 2kDa 到大约 100kDa 之间（术语“大约”意指聚乙二醇制品中，
15 一些分子大于所述分子量，另一些分子小于所述分子量）。下面的实施例 1 及实施例 2 涉及 PEG6000，其选择便于纯化及提供一个合适的模式系统。其它大小的使用取决于所需的治疗方案（情况例如所需的缓释持续时间，效力如果在生物活性方面有效的话，处理的方便性，抗原性大小或缺乏以及其它一些 PEG 对治疗性蛋白质及其类似物的已知效应。

20 本发明的一个具体方面就是 N - 末端单个 PEG 化的 G - CSF 分子，它由一个聚乙二醇部分和一个 G - CSF 部分组成。对于该组合物，人们可从多种聚乙二醇分子（以分子量及有无分枝等），反应混合物中聚乙二醇分子对 G - CSF 蛋白质分子的比例，所进行的 PEG 化反应的类型，获得选择性 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 的方法及所要使用的 G - CSF 的
25 类型等方面进行选择。此外，本组合物及方法还包括药用组合物的配方，药剂的治疗和生产方法。

聚乙二醇分子对蛋白质分子的比例与它们在反应混合物中的浓度一样，可以改变。一般来说，最佳比例（是指反应效率而言，即反应混合物中没有多余未反应的蛋白质及聚合物分子）将根据所选聚乙二醇分子
30 量进行测定。此外，正如本方法的一个实施例中涉及的非特异性 PEG 化反应和随后的 N - 末端单个 PEG 化产物的纯化，比例取决于可参加反应的可得到的反应基团数（典型的是 α 或 β 氨基）。本文的一个实施例

中涉及的蛋白质：PEG 分子的反应比例相当低以获得基本上为单个 PEG 化的产品（每个蛋白质分子对 1.5 个 PEG 分子）。

为了获得 N - 末端 PEG 化的 G - CSF，也有多种如上所述的或者在下面实施例 2 中所述的还原性烷基化反应的 PEG 化反应方法可供选择。

5 有关聚乙二醇部分与蛋白质部分之间无连接基团的聚合方法在 Francis et al 在：蛋白质药品的稳定性：体内降解途径及使蛋白质稳定的策略（Eds. Ahern, T. and Manning, M. C. Plenum, New York, 1991）中已有过描述。另外，Delgado et al., “通过 Tresyl Chloride 激活方法偶联 PEG 到蛋白质在免疫亲合细胞制品中的应用”及
10 Fisher et al., eds., 水相系统分离在细胞生物学及生物技术中的应用, Plenum Press, N. Y. N. Y., 1989 pp. 211 - 213 中涉及利用 tresyl chloride，从而使聚乙二醇部分和蛋白质部分间没有连接基团存在。该方法由于会产生毒副产品，故很难用于生产治疗用产品。本发明的一个实例中涉及使用羧甲基甲氧聚乙二醇的 N - 羟基琥珀酰
15 脂。正如下面将会更为详细地讲座的另一实施例涉及使用还原性烷基化反应方法。

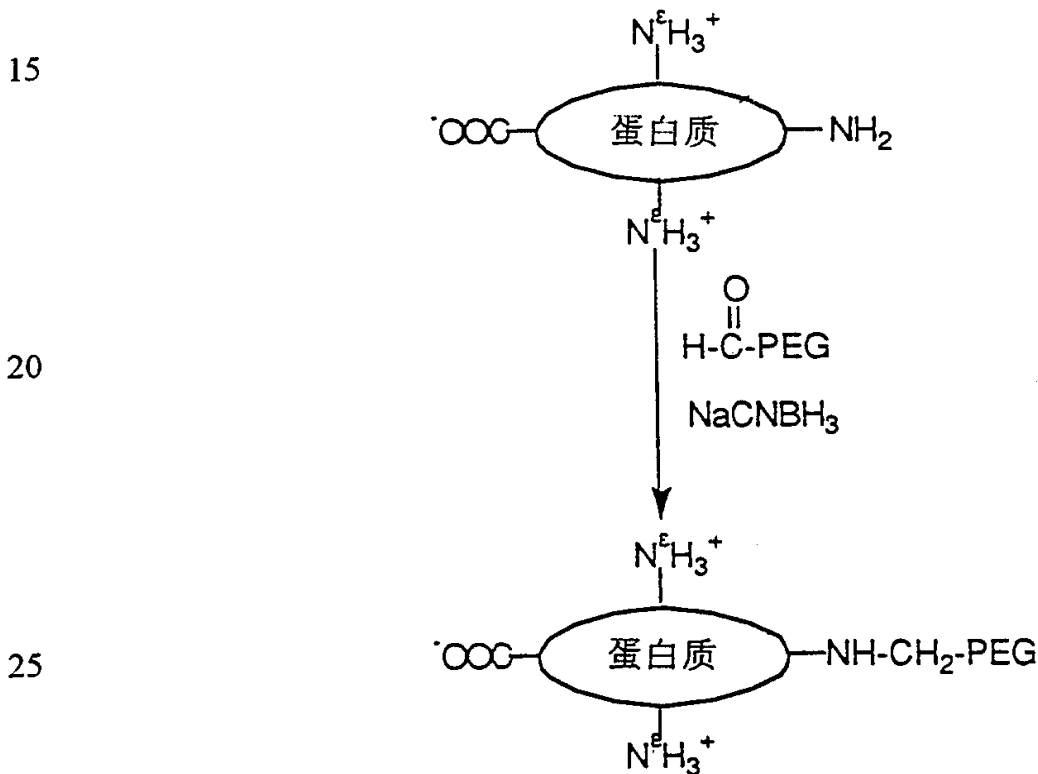
获取 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 制品的方法（即，如有必要，把该部分从其它单个 PEG 化的部分中分离出来）可以经过从 PEG 化的 G - CSF 分子群体中纯化 N - 末端 PEG 化的产物。例如，在下面的实施例中，PEG
20 化的 G - CSF 首先通过离子交换色谱分离以获得具有电荷特征的单个 PEG 化物质（可能存在含有相同的表观电荷的其它多个 PEG 化的物质），然后使用分子筛层析（size exclusion chromatography）分离单个 PEG 化的产品。通过这种方法，将 N - 末端单个 PEG 化的 G - CSF 从其它类型的单个 PEG 化的物质及其它多个 PEG 化的物质中分离出来。其它方法
25 已见报道。例如，PCT WO 90/04606，（1990 年 5 月 3 日公开）中报道了一种分离 PEG - 蛋白质加合物混合物的方法，其中包括用含 PEG 的水性两相系统 PEG/分离（partitioning）蛋白质加合物。

在另一方面，本发明还提供了选择性获得 N - 末端化学修饰蛋白质（或其类似物）的方法。下述为一种利用还原性烷基化反应进行蛋白质
30 修饰的方法，它利用可获得的一价氨基（primary amino group）（赖氨酸对 N 末端）的不同类型的特异性反应来进行特定蛋白质的修饰。在适当的反应条件下，成功地用带有聚合物的羧基将蛋白质的 N - 末端进

行了选择性的修饰。在能够利用赖氨酸残基上 ϵ -氨基和蛋白质 N-末端 α -氨基的 pKa 差异的 pH 下进行该反应。通过这种选择性修饰，控制水溶性聚合物附着到蛋白质上：聚合物的连接主要发生在蛋白质的 N-末端，而其它反应基团（如赖氨酸残基上的侧链氨基）则没有明显的修饰发生。

更为重要而且令人惊奇的是，本发明提供了一种制备单聚体/蛋白质连接物分子的基本上均一的制品的方法，不需使用其它化学修饰化学方法所需的进一步纯化。此外，具有胺键的产物出乎意料地比以酰胺键形成的产物更稳定。这一点将会在下方的详细研究中得到证明。更具体地说，如果使用聚乙二醇，本发明还提供了没有可能的抗原性连接基团，并具有直接偶联到蛋白质部分的聚乙二醇部分而无毒副产品的 N-末端 PEG 化的蛋白质。

反应可见下图描述（图中氨基硼氢钠为举例性还原剂）：



因此，本发明的一方面内容是制备聚合物/蛋白质连接物的方法，包括：（a）在还原性烷基化反应条件下，将含多于一个氨基的蛋白质分子与水溶性聚合物分子反应，反应液的 pH 应适于选择激活所述蛋白质分子氨基末端的 α -氨基，所以所述水溶性聚合物附着于所述 α -氨基基团，以及；（b）获取反应产物。可从任选从未反应的分子中分离反

应产物，但对于治疗用产品来说，这是优选的。

5 本发明的另一方面内容是这种还原性烷基化反应，它能够将聚合物分子选择性地附着到任意在 N - 末端具有 α - 氨基的蛋白质上，并提供了一种单聚体/蛋白质连接物的基本上均一的制品。这里所用的术语“单聚体/蛋白质连接物”意指由一个聚合物部分附着到一个蛋白质部分上组成的组合物（也包括本文所述的使用蛋白质类似物的那些连接物）。单聚体/蛋白质连接物具有位于 N - 末端而不是侧链氨基上（如赖氨酸侧链的氨基）的一个聚合物部分。制品优选含大于 80 % 的单聚体/蛋白质连接物，更优选大于 95 % 的单聚体/蛋白质连接物。

10 对于基本均一的单聚体/蛋白质连接物分子群体，其反应条件应是让水溶性聚合物分子选择性地附着到所需蛋白质的 N - 末端上。这种反应条件一般造成赖氨酸氨基与 N - 末端 α - 氨基的 pKa 差异（pK 是指氨基质子化和非质子化各占 50 % 时的 pH）。一般来说，对于不同的蛋白质，可使用不同的 pH 以使 N - 末端 α - 氨基得到最佳修饰。

15 pH 往往也会影响所用的聚合物分子与蛋白质分子的比例。一般来说，如果反应液 pH 低于 pK，聚合物分子比例应大大超过蛋白质分子为宜（即：N - 末端的 α - 氨基反应性越少，达到最佳条件所需的聚合物越多）。如果 pH 高于 pK，则聚合物：蛋白质分子的比例不必要太大（即得到的反应基团越多，所需的聚合物分子越少）。

20 另一个需要考虑的重要条件是聚合物的分子量。一般来说，聚合物的分子量越大，结合到蛋白质上的聚合物分子数越少。同样，在优化这些参数时，聚合物分子是否有分枝也应加以考虑。总之，聚合物分子量越高（或分枝越多），聚合物：蛋白质的比例亦应越高。

25 对于这个还原性烷基化反应，其还原剂在水溶液应该比较稳定，最好仅能还原在还原性烷基化反应初始阶段所形成的西佛碱（Schiff base）。优选的还原剂可选自硼氢化钠，氰基硼氢钠，硼酸二甲胺，硼酸三甲胺以及硼酸吡啶。在下面实施例中使用的是氰基硼氢钠。

30 水溶性聚合物分子可以是上面描述的类型，其分子中应具备单个反应醛基使其偶联到蛋白质分子上。对于聚乙二醇，使用用于与 G - CSF 偶联及 PEG12000 用于和共有干扰素偶联在下面描述。值得一提的是对于 G - CSF，本方法中，PEG 12000，20000 及 25000 均被成功地使用过。聚乙二醇丙醛（见美国专利 No. 5, 252, 714）由于其在水中有较好的

稳定性而具有一定优势。

如上所述，本方法广泛适用于具有 N - 末端 α - 氨基的任何蛋白质及其类似物。例如，由细菌表达外源性 DNA 而获得的蛋白质产品，由于细菌表达的结果，其 N - 末端的甲硫氨酸 (methionyl) 残基上带有一个 α - 氨基。如上所述，包括肽在内，均是一些肽类似物及其它的修饰蛋白质。蛋白质类似物，如上所述的 G - CSF 类似物及非天然存在的共有干扰素均适用于此方法。

因此，对于该 N - 末端化学修饰的 G - CSF，本文所述的任意 G - CSF 或其类似物均合用（例如，出处同上的文章所描述的那些）。下面实施例中所用的是细菌中产生的重组 G - CSF，具有 174 个氨基酸残基及一额外的甲硫氨酸残基。如本文所述，化学修饰可使用本文描述的任何水溶性聚合物分子进行，下面的实施例中使用的是聚乙二醇。

共有干扰素是本实施例中所用的另一种蛋白质。下面要描述的是用本发明中的还原性烷化的反应进行蛋白质 N - 末端的单个 PEG 化修饰，从而制备出化学修饰的共有干扰素。因此，本发明的另一方面涉及这些制品。正如本文所用的，共有人淋巴细胞干扰素在此称为“共有干扰素”，或“IFN - con”，意即为一个非天然多肽，它主要包括所有天然人白细胞干扰素亚型序列共有的那些氨基酸残基，而且它还包括在所有亚型无共同氨基酸的一个或多个位置上，主要发生于该位置一个氨基酸，并且在任何情况下，不包括在至少一个天然存在的亚型中不出现于该位置的任意氨基酸残基。IFN - con 包括三个氨基酸序列，分别命名为 IFN - con1、IFN - con2 及 IFN - con3，它在共同拥有的美国专利 4, 695, 623 及 4, 897, 471 中公开，本文引用其全文以供参考。（美国专利 Nos. 4, 897, 471 及 4, 695, 623 中使用“ α ”命名，而本文未用）。编码 IFN - con 的 DNA 序列可按上述专利或其它标准方法进行合成。IFN - con 多肽最好是通过转化或转染合成的 DNA 序列到细菌宿主中，尤其是 *E. coli* 表达产生。即 IFNcon 是重组 IFN - con。以本领域的技术人员已知的方法和在 Klein et al., J. Chromatog. 454 : 205 - 215 (1988) 中描述的用于 IFN - con1 的方法可纯化优选在 *E. coli* 中生产出的 IFN - con。纯化的 IFN - con 可能包括其异构体的混合物，如纯化的 IFN - con1 中可能包含有甲硫酰 IFN - con1，去甲硫酰 IFN - con1 及 N - 末端封闭的去甲硫酰 IFN - con1 (Klein et al.,

Arc. Biochem. Biophys. 276 : 531 - 537 (1990))。作为选择, IFN - con 可包括特异性分离的异构体, 可用本领域技术人员已知的诸如等电点聚焦的技术来彼此分离 IFN - con 的异构形式。

因此, 本发明的另一方面内容是化学修饰的共有干扰素, 其中所说的共有干扰素是选自 IFN - con1, IFN - con2, 及 IFN - con3。化学修饰时用本文所述的水溶性聚合物例如 PEG, 以及用于 N - 末端选择性化学修饰的还原性烷基化方法。本文的实施例 3 中描述了 IFN - con1 的化学修饰, 包含将 IFN - con1 分子在 N - 末端与聚乙二醇分子 (PEG 12000) 相结合。

10 另一方面, 本发明方法生产出的 PEG 化蛋白质是聚乙二醇部分直接与蛋白质部分相连接, 没有联接基团存在, 也不产生任何毒副产品。实施例中包括 G - CSF 及本文所述的共有干扰素。对于 PEG 化 G - CSF 蛋白质分子的群体, 其中聚乙二醇部分是直接偶联到 G - CSF 蛋白质部分上 (但并不一定是 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 分子的群体), 还原性烷基化反应可以在酸性或非酸性环境中进行。

本发明还有一方面是关于上述有关药用组合物。这种药用组合物可适于注射, 或者是口服, 作用于肺、鼻腔以及其它形式的施用。一般来说, 包含于本发明中的药用组合物包含有效量的本发明的单聚体/蛋白质连接物产物以及药用上可接受的稀释剂, 保存剂, 增溶剂, 乳化剂, 佐剂及/或载体。这类组合物中包括各种缓冲液组份 (如: Tris - HCl, 醋酸盐, 磷酸盐), pH 及离子强度的稀释剂; 添加剂诸如去污剂及增溶剂 (如: Tween 80, 多聚山梨醇酯 80), 抗氧化剂 (如抗坏血酸, 偏亚硫酸氢钠), 保存剂 (如: 水杨乙汞, 苯甲醇) 以及填充物质 (如: 乳糖, 甘露醇); 将这些物质掺入聚合物分子如聚乳酸 (polylactic acid), 聚乙二醇酸等做成的颗粒状制品中或掺入脂质体中。这些组合物可能会影响本发明的 N - 末端化学修饰的蛋白质的物理状态稳定性, 在体内的释放速度及体内清除速度。例如参见 Remington's 《药理学》第 18 版。 (1990, Mack 出版公司., Easton, PA 18042) pp. 1435 - 1712。本文引用以供参考。

30 本发明再有一个方面是涉及药品的治疗和生产方法。施用本发明生产的聚合物/G - CSF 连接物 (或具有天然 G - CSF 的促血细胞生成活性的类似物) 来缓和或调理的症状的典型特征在于, 造血或免疫功能的减

退，而且更具体地说是中性粒细胞数的减少。这些症状也许是因为治疗其它疾病过程中（例如化疗或放疗）引起的。这也可能是由于患感染性疾病，比如细菌、病毒、真菌或其它一些感染疾病。例如，由于细菌感染所致败血症。或者，这种症状由遗传或环境因素造成的，如严重慢性嗜中性粒细胞减少症或白血病。年龄因素也很重要，在老年病学中，病人的嗜中性白细胞数目会减少或嗜中性白细胞活动性降低。一些这类症状见Filgrastim (r-met Hu G-CSF) in clinical Practice, Morstyn, G. 及 T. M. Dexter 编., Marcel Dedder Inc., N. Y. (1993), pp. 351。其它一些研究不多的可经过施用本发明的聚合物/G-CSF连接物来缓和和调节的症状还有血液中脂类(或胆固醇)的减少，一些心血管症状，因为G-CSF可诱导产生纤维蛋白溶酶原激活因子。截止目前，G-CSF(或类似物)在这些情况中的激活模式还不十分清楚。水溶性聚合物分子(如聚乙二醇)的添加，可给施用的病人带来好处，因为生物活性的延缓滞留可允许每个疗程的G-CSF注射次数更少。

一般来说，施用本发明生产的聚合物/共有干扰素可缓解和调理的症状是那些可应用干扰素的症状，包括细胞增殖紊乱，病毒感染及自体免疫紊乱，如综合性血管硬化症。参考McManus Balmer, DICP, “药物治疗年鉴” 24: 761 - 767 (1990) (具有生物活性的修饰因子在癌症治疗中的应用: 回顾。第一部分，干扰素)。用共有干扰素治疗细胞增殖紊乱的方法及其组合物可参见1992年4月30日公开的PCT WO 92/06707, 本文引用以供参考。例如，肝炎(A、B、C、D、E型)可用本发明生产的PEG化共有干扰素分子来治疗。在下面的实施例中证明在体外，化学修饰的共有干扰素活性为非化学修饰的共有干扰素的20%。

上述的各种分子，由于进行了进一步的研究，因而获得了有关不同病人中不同的症状的治疗时所用的合适剂量水平的资料。普通技术人员在考虑治疗方案，病人年龄及健康状况后，可确定合适的剂量。一般来说，对于注射或灌注剂量应在每千克体重0.01 μ g至100 μ g之间(只计算蛋白质部分的重量，没有计算化学修饰部分的重量)。

下面的实施例将说明以上提及各方面。在实施例1中，通过N-末端PEG化的G-CSF与35赖氨酸或41赖氨酸(为met + 174氨基酸G

- CSF 变体) 单个 PEG 化的 G - CSF 相比较来证实前者的优点。实施例 2 中描述了在 N - 末端 PEG 化 G - CSF 过程中的还原性烷基化反应。本方法能够制备 N - 末端 PEG 化 G - CSF 的基本均一的制品。实施例 3 中讨论了在共有干扰素 N - 末端 PEG 化中的还原性烷基化反应。

5

实施例 1

A. 重组人类 met - G - CSF 制备

重组人类 met - G - CSF (本文有时称为 “ rh - G - CSF ” 或 “ r - met - hu - G - CSF ”) 按照 Souza 专利, 美国专利 No. , 4, 810, 643 (本文引用以供参考) 的。方法合用的 rhG - CSF 是来自 E. coli 的重组表达产物其氨基酸序列 (由 DNA 序列编码) 所示如下 (SEQ. ID. NO. 1 和 2) :

15

ATG ACT CCA TTA GGT CCT GCT TCT TCT CTG CCG CAA AGC TTT CTG
M T P L G P A S S L P Q S F L

CTG AAA TGT CTG GAA CAG GTT CGT AAA ATC CAG GGT GAC GGT GCT
L K C L E Q V R K I Q G D G A

GCA CTG CAA GAA AAA CTG TGC GCT ACT TAC AAA CTG TGC CAT CCG
A L Q E K L C A T Y K L C H P

GAA GAG CTG GTA CTG CTG GGT CAT TCT CTT GGG ATC CCG TGG GCT
E E L V L L G H S L G I P W A

CCG CTG TCT TCT TGT CCA TCT CAA GCT CTT CAG CTG GCT GGT TGT
P L S S C P S Q A L Q L A G C

20

CTG TCT CAA CTG CAT TCT GGT CTG TTC CTG TAT CAG GGT CTT CTG
L S Q L H S G L F L Y Q G L L

CAA GCT CTG GAA GGT ATC TCT CCG GAA CTG GGT CCG ACT CTG GAC
Q A L E G I S P E L G P T L D

ACT CTG CAG CTA GAT GTA GCT GAC TTT GCT ACT ACT ATT TGG CAA
T L Q L D V A D F A T T I W Q

25

CAG ATG GAA GAG CTC GGT ATG GCA CCA GCT CTG CAA CCG ACT CAA
Q M E E L G M A P A L Q P T Q

GGT GCT ATG CCG GCA TTC GCT TCT GCA TTC CAG CGT CGT GCA GGA
G A M P A F A S A F Q R R A G

GGT GTA CTG GTT GCT TCT CAT CTG CAA TCT TTC CTG GAA GTA TCT
G V L V A S H L Q S F L E V S

TAC CGT GTT CTG CGT CAT CTG GCT CAG CCG TAA TAG
Y R V L R H L A Q P * *

30

(这也是用于对照动物的非 PEG 化的组合物) 。 作为选择, 也可选用市场上的 Neupogen 进行下面的 PEG 化反应 (本文引用其包装说明书以供

参考)。

B. PEG化的G-CSF的制备

100mM pH 8.0的N-二羟乙基甘氨酸, 内含10mg/ml的上述rh-G-CSF的溶液, 加入到平均分子量为6000道尔顿的固态SCM-MPEG中 (羧甲氧聚乙二醇N-羧琥珀酰酯) (Union Carbide)。这里的SCM-MPEG要比rh-G-CSF多1.5摩尔。轻轻搅动1小时后, 混合物以无菌水稀释至2mg/ml, pH以稀盐酸调至4.0。反应在室温下进行。此时反应混合物主要由三种形式的单个PEG化rh-G-CSF, 一些双PEG化的rh-G-CSF和未修饰的rh-G-CSG及反应副产品(N-羧琥珀酰亚胺)组成。

C. N-末端PEG化rh-G-CSF的制备

三种形式的单个PEG化的rh-G-CSF可用离子交换色谱加以分离。反应混合物上样于(1mg蛋白质每毫升树脂) Pharmacia S Sepharose FF柱(Pharmacia XK50/30库, 柱床体积440ml), 以缓冲液A(20mM的醋酸钠, pH 4.0)加以平衡。然后以3倍于柱床体积的缓冲液A清洗。蛋白质样品用15倍于柱床体积的缓冲液B(20mM醋酸钠, pH 4.0, 1M NaCl), 其浓度梯度从0~23%进行线形梯度洗脱。洗脱后柱床以等体积100%的缓冲液B加以清洗再以3体积的缓冲液A重新平衡。整个过程的流速应维持在8ml/min。洗脱液在280nm处加以监测, 以5ml每管分部收集。按照图1A合并含各单PEG化rh-G-CSF种类的馏分。将这些合并物用带YM10 76mm膜350mL Amicon搅拌室(stirred cell)浓缩。

将来自离子交换色谱的合并液进行分子筛层析, 以使双PEG化的蛋白质产物从单PEG化的蛋白质得以分离。大多数情况下, 2-5ml溶液中含5-10mg样品的混合物上柱, 柱为120ml Pharmacia Superdex 75HR 16/60, 以20mM的pH 4.0的醋酸钠将柱平衡。以1.5ml/min流速洗脱100分钟。以2ml每管分部收集。洗脱液中蛋白质含量在280nm处加以监测。合并不同峰的馏分并进行下一步的分析。下表中比较每个峰处产量的相对比例。

30

表 1
相对产量和修饰位点

| 修饰位点 | 参考图 1A | 相对产量 |
|------------|--------|------|
| N - 末端 | 峰 1A | 3 |
| 5 Lys - 35 | 峰 2A | 2 |
| Lys - 41 | 峰 3A | 1 |

在这种反应条件下, 17 及 24 位的赖氨酸可能不会发生明显的 PEG 化反应。

D. 特征描述

10 为了鉴定每个样品的特征, 从五个方面加以分析: (1) SDS - Page (图 1B), (2) 分子筛层析 HPLC (“SEC HPLC”) (图 2), (3) 肽 (酶切) 分离图谱分析 (图 3A、3B 及 3C), (4) 在体外对 G - CSF 生物活性的测试 (图 4) 及 (5) 在体内 (仓鼠体内) 对其生物活性的测试 (图 5A 及 5B)。

15 对于每个样品组合物, 结果显示, 对于 N - 末端单个 PEG 化 G - CSF 来说, 样品中被 PEG 化的比例已超过 95%, 余下的也许是未 PEG 化的物质 (尽管样品中余下的低于试验检测极限)。至于三种形式单个 PEG 化产物 (N - 末端、赖氨酸 41 和赖氨酸 35) 的各自百分含量, 结果显示, N - 末端及赖氨酸 41 PEG 化产物已超过单个 PEG 化总产物的 97%, PEG
20 化的赖氨酸 35 产率较低, 可能是由于其在被测试条件中不稳定造成的。

表 2

N - 末端 PEG 化 G - CSF 组合物的百分比

| | 非还原性 SDS PAGE | SEC HPLD | N - 末端测序* |
|----------------------|---------------|----------|-----------|
| 25 单个 PEG 化的 G - CSF | 97.44 | 99.43 | 96.6 |
| 未修饰的 G - CSF | 2.56 | 0.57 | 3.4 |

* 下面讨论的 N - 末端测序在此不能认为是定量试验, 因为在进行 N - 末端测序时, 可能会造成聚乙二醇分子从蛋白质分子 N - 末端脱落下来。

30

表 3

三种形式的单个 PEG 化产物百分比

| | N - 末端 PEG - GSCF (RI/UV=.96) * | Lys 35 PEG - GSCF** (RI/UV=.72) | Lys41 PEG - GSCF (RI/UV=1.12) |
|------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 5 非还原性 | 97.44 | 77.41 | 100.00 |
| SDS - PAGE | | | |
| SEC HPLC | 99.43 | 93.38 | 99.96 |

* RI/UV 为折射光与紫外光吸收比例的指数, 其主要用来估计每个蛋白质分子中含有聚乙二醇的分子数。应用聚乙二醇分子的折射和反映蛋白质分子的紫外光吸收的指数, 从 SEC HPLC 数据计算。

** 这种形式 G - CSF 在测试条件下不稳定。

方 法

1. SDS - PAGE. SDS - PAGE 使用的是 ISS Daiichi Pure
15 Chemicals, Co., Tokyo, Japan 生产的非还原性 4 ~ 20 % 的凝胶, 并以考马斯亮蓝染色。凝胶以分子动态显像密度计 (molecular Dynamics Densitometer with Image Quant) 加以扫描。结果: 如图 1B 所示。1 号泳道(左手一边为一标准分子量蛋白 (Novex Mork 12 分子量标准品)。2 道为 3 μ g rh - G - CSF 标准; 3 道为上样 10 μ g
20 SCM - PEG - GCSF 反应混合物电泳结果; 4 道内加的是 10 μ g N - 末端单个 PEG 化的 G - CSF; 5 道内为 10 μ g 从 N - 末端 met 数起, 第 35 位赖氨酸残基单个 PEG 化的 G - CSF; 6 道为 10 μ g 从 N 端甲硫氨酸起第 41 位赖氨酸单个 PEG 化的 G - CSF。从图可以看出, 3 道中含有 N - 末端单个 PEG 化产物, 并显示出单条带。

25 2. 分子筛层析 - 高压液相色谱

SEC - HPLC 使用的是 Biosep SEC 3000 柱, 在水相 HPLC 系统中进行的, 并使用 100mM 磷酸钠, 在 pH 6.9 条件下, 以 1ml/min 流速洗脱 20min。监测 280nm 处的信号。结果: 如图 2 所示, 线“C”, 因为只含
30 N - 末端单个 PEG 化的 rh - G - CSF, 故只有一个峰, 线“D” (赖氨酸 35 单个 PEG 化产物) 和“E” (赖氨酸 41 单个 PEG 化产物) 情况相同。这也显示单个 PEG 化 G - CSF 在不同收集管中是基本上纯的。

3. 肽酶切分离图谱。使用下述方法, 对三种样品 (称为“Mono -

PEG - 1”、“Mono - PEG - 2”及 Mono - PEG - 3”)加以分析。(a) 还原性烷基化反应。500 μ g 的单个 PEG 化 G - CSF 等分样品进行快速真空干燥, 将其在含 6M 盐酸胍及 1mM EDTA 的 0.3M Tris - HCl 中配制成 1mg/950 μ l 浓度, 缓冲液 pH 8.4。样品中加碘乙酸进行 S - 羧甲基化, 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育反应 20 分钟。样品然后用 Sephadex G - 25 快速旋转蛋白分离柱 (Quick Spin Protein Columns) 进行脱盐处理, 后更换缓冲液。经脱盐和更换缓冲液后, 样品浓度用增加的缓冲液将其稀释至 0.5mg/ml。(b) 蛋白质内切酶 SV8 消化。样品以 SV8 (酶与底物比为 1 : 25) 在 25 $^{\circ}$ C 消化处理 26 小时。(c) HPLC 肽酶切分离图谱。消化后的蛋白质装入 Vydac C4 柱 (4.6 \times 250mm, 颗粒直径 5 μ , 孔径 300), 以 0.1% TFA 中乙腈的线性梯度进行洗脱, 经 HPLC 作肽图。肽段人工收集后置快速真空干燥器 (Speed Vac) 中将其干燥后以备测序之用。结果: 与对照标准样相比, (i) (图 3A) 为 “Mono - PEG - 1” (即 N - 末端单个 PEG 化产物), 57.3 分钟时峰值减小而在 77.5 分钟时出现一新峰; (ii) (图 3B) 为 “Mono - PEG - 2”, (赖氨酸 35 PEG 化产物), 在 30.3 分钟时峰的高度有所下降并在 66.3 分钟时出现一新的洗脱峰; (iii) (图 3C) 为 “Mono - PEG - 3” (赖氨酸 41 PEG 化产物), 30.3 分钟时的峰消失, 而在 66.4 分钟时出现一新的洗脱峰。这些肽段在分离图谱中都显示出显著的差异。从图还可以看出由于微小的消化差异在 86.1 分钟肽的两侧出现一些小的不完全裂解物。(d) N - 末端测序分析。上面图谱中每个 “新” 肽段都要经过 N - 末端序列分析来鉴定。干燥后的肽段溶于 0.1% TFA, 在 ABI 蛋白质测序仪中进行测序。对于 “Mono - PEG - 1” (N - 末端 PEG 化产物), 60% 的 “新” 峰产物 (77.5 分钟时) 进行了 10 个循环的测序。起始得率 5%, 这意味着 N - 末端的甲硫氨酸残基被聚乙二醇分子。封闭。必须注意到, 象这种起始肽应该引起 0 起始得率, 这里的小于 5% 值可能是由于在测序分析过程中造成聚乙二醇分子从 N - 末端甲硫氨酸上脱落下来所致。N - 末端肽段序列测定结果为: M - T - P - L - G - P - A - S - S。对于 “Mono - PEG - 2” (赖氨酸 35 PEG 化产物), 收集了 66.3 分钟处峰值总体积的 80%, 并对其进行 9 轮循环测序。赖氨酸 35 的回收率相当低, 意味着 PEG 化发生在 35 位赖氨酸上。而 41 位的赖氨酸回收率与其它氨基酸残基一样, 说明该残基未发生修饰。肽在

30.3 分钟处的峰高比相应标准参照图要低, 肽在 30.3 分钟处的峰面积只
为相应肽的 57.5%, 对其序列测定结果为 K - L - C - A - T - Y - K
- L。对于“Mono - PEG - 3”(赖氨酸 41 PEG 化产物), 对于在 66.4
5 分钟洗脱的肽收集了峰总体积 80% 的样品, 并对其进行 9 个循环的测
序, 检测的序列为 K - L - C - A - T - Y - K - L, 其中含 35 和 41
赖氨酸残基。35 位赖氨酸的回收率与其它残基回收率一致, 41 位的赖
氨酸的回收率相当低, 意味着 PEG 化在该处发生。结果: “Mono - PEG
- 1”为 N - 末端单个 PEG 化产物; “Mono - PEG - 2”为 35 赖氨酸
部分 PEG 化产物; “Mono - PEG - 3”为 41 赖氨酸 PEG 化产物。通过
10 比较对照标准样(非 PEG 化 G - CSF)和单个 PEG 化的 G - CSF 1、2
和 3 的图谱, 可以看出“Mono - PEG - 2”(Lys 35)和“Mono - PEG
- 3”(Lys 41)二者图谱 N - 末端肽峰高都略微有所下降。这说明赖
氨酸 35 和赖氨酸 41 的产物中均混杂有少量的 N - 末端 PEG 产物, 或者 N
- 末端的甲硫氨酸有少部分被 PEG 化。

15 4. 体外活性。该物质有活性。图 4 显示的为体外分析结果。从图可
以看出, N - 末端单个 PEG 化产物具有未修饰的 rhG - CSF 活性的 68%。
方法: G - CSF 体外生物测定是合用鼠 32D 细胞 G - CSF 依赖性克隆的
促有丝分裂试验。细胞以含 5% FBS 和 20 ng/ml rhG - CSF 的 Iscoves
培养基进行培养。在加样品之前, 细胞用不含 rhG - CSF 的生长培养基
20 冲洗 2 次。以 48 至 0.5 ng/ml 浓度范围(相当于 4800 ~ 50 IU/ml)作
12 个点的 rhG - CSF 标准曲线。在标准曲线尝试范围内每份样品制备估
计落在标准曲线线型部分内(1000 到 3000 IU/ml)的 4 种稀释液, 并
以一式三份。由于这些样品显然在体外活性较低, PEG 化 rhG - CSF 样
品一般稀释不到 4 ~ 10 倍。每份 40 μ l 体积的样品或标准样稀释液加
25 到含 10,000 细胞/孔的 96 孔微滴度板的合适小孔中。在 5.5% CO₂, 37
℃培养 48 小时后, 每孔加入 0.5 μ mCi 甲基 - ³H - 胸腺嘧啶。18 小时
后, 收获平板细胞并计数, 作出剂量反应曲线(logrhG - CSF 浓度对 CPM
- 背景)并对落在标准曲线线型部分范围内的点进行线性回归分析。用
所得的线性方程及稀释系数校正来测定未知试验样品的浓度。结果: 如
30 图 4 所示。从图 4 可以看出, 三种单个 PEG 化形式中, N - 末端单个 PEG
化 G - CSF 在体外显示最高生物活性。

5. 体内活性。体内测定也证实了 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 的活性。

体内测定是给金黄地鼠皮下一次注射 0.1mg/kg 体重剂量的样品而进行的。每组 4 只动物在每个时间点经尾部抽血。收集的血样当天进行全血细胞计数，并计算出白细胞平均数目。从图 5A 及 5B 可以看出，在皮下单次注射 0.1mg/kg 体重剂量样品 1 天后出现作用高峰。两种单个 PEG 化产物（N - 末端及赖氨酸 35）显示出延长的反应，而对赖氨酸 41 PEG 化的蛋白质的反应在体内并没显示出比未修饰的 rhG - CSF 活性增强（从图 5B 可看出，其实活性还更差一些）。这些结果表明在蛋白质分子上附着聚乙二醇分子能显著改变蛋白质的治疗效果并且 PEG 化蛋白质的益处还取决于修饰位点。（单次皮下注射后曲线下的 WBC 净平均面积（根据 CRC 标准数学表，26th Ed. (Beyer, W. H., Ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1981. p. 125 来计算）与 Lys - 35 及 N - 末端单个 PEG 化产物一致）。

E. 稳定性研究

另外，对上面制备的 N - 末端及 35 赖氨酸单个 PEG 化 G - CSF 稳定性进行了研究。（41 赖氨酸 PEG 化产物未被研究是因为已证实其没有超出未修饰的 G - CSF 的额外活性）。研究表明 N - 末端 PEG 化的 G - CSF 在贮存时出人意料地要比单个 PEG 化的 G - CSF 的其它形式赖氨酸 35 单个 PEG 化产物更稳定。稳定性是以 SEC - HPLC 监测到产物裂解来测定的。方法：N - 末端 PEG 化 G - CSF 及赖氨酸 35 单个 PEG 化 G - CSF 研究在 4 °C 2 个 pH 条件下完成的，即 pH 4.0 和 pH 6.0，每个周期 16 天。将 pH 升至 6.0 是为了使稳定性研究得以更快地进行。pH 6.0 时，上述所得的 N - 末端单个 PEG 化 G - CSF 和赖氨酸 35 单个 PEG 化 G - CSF 置于含 20mM 磷酸钠、5mM 醋酸钠、2.5 % 甘露醇、0.005 % Tween - 80，pH 为 6.0 的缓冲液中至蛋白质终浓度为 0.25mg/ml。每毫升等份液贮于 3ml 无菌注射瓶中。每个注射瓶于 4 °C 及 29 °C 各保存 16 天。由 SEC - HPLC 绘图来分析其稳定性。如果后来的测量结果与最初测量结果（时间 = 0）保持一致（由肉眼观察确定），则样品在那段时间内被认为是稳定的。

结果：如图 6A - 6C 所示。

（a）4 °C pH 6.0 条件下比较。图 6A 显示 pH 6.0，4 °C 条件下 N - 末端单个 PEG 化 G - CSF 经过一定时间段后的 SEC - HPLC 图；图 6B 所示为赖氨酸 35 单个 PEG 化 G - CSF 在 pH 6.0，4 °C 条件下经过一定时间

段后的 SEC - HPLC 图。有一种解释认为赖氨酸 35PEG 化产物的裂解物中，有的分子量正好与未修饰的 G - CSF 相近。

(b) pH 4.0, 4 °C 条件下期限延长。pH 4.0, 4 °C 条件下提供的控制条件是一个相当稳定的条件，在该条件下 N - 末端 PEG 化 G - CSF 不降解。对于赖氨酸 35PEG 化产物，仍发生产物的降解，但其速率要缓慢得多。

(c) pH 4.0, 4 °C 条件下的稳定性比较。图 6C 显示在这些条件下，延长时间期限时，G - CSSF 的单个 PEG 化产物的 SEC - HPLC 图。从图可以看出，在 pH 6.0, 4 °C 条件下，PEG 化的赖氨酸 35 在 16 天或 35 天时的去 PEG 水平增加不高于 6 天时所见水平（见图 6B）。这意味着去 PEG 化水平（不稳定性）有 6 天后，该条件下一直保持未变。

实施例 2

本实施例陈述了一种利用还原性烷基化反应来制备单个 PEG 化 G - CSF 的基本上均一的群体的方法，和该群体的特征鉴定。在此使用了上面实施例所述的重组 G - CSF。可以看出，此方法不仅在制备 N - 末端化学修饰的蛋白质方面具有优越性，而且本还原性烷基化反应过程中的胺键产生实质上更稳定的产物，正如在贮存时聚集程度的较大差异所显示的。

A. 在 N - 末端 α - 氨基残基上附着的单甲氧聚乙二醇 - GCSF 连接物的制备。

制备 rhG - CSF 反应溶液（1ml，浓度为 5mg/ml，如上面实施例中所述），内含 100mM 磷酸钠，pH 5.0，还含有 20mM NaCNBH_3 ，将其充分搅拌冷冻（4 °C）后，加入摩尔数超出 5 倍的甲氧聚乙二醇醛（MPEG）（平均分子量为 6kDa）。反应混合物在相同温度下持续搅拌。

反应过程中蛋白质的修饰程度用 SEC - HPLC 来对其监测，SEC - HPLC 使用的是 Bio - Sil SEC 250 - 5 柱（BIO - RAD），在 pH 6.8 条件下，用 0.05M NaH_2PO_4 ，0.05M Na_2HPO_4 ，0.15M NaCl ，0.01M NaN_3 ，缓冲液以 1ml/min 流速进行洗脱。

10 小时后 SEC HPLC 分析结果显示，已有 92 % 的蛋白质转变成 mono - MPEG - GCSF 衍生物。这从图 7 可以看出，其中记录了蛋白质浓度（以在 A280 处的吸光率测得），显示了在 8.72 分钟时出现的单个 PEG 化 G - CSF 产物的洗脱峰，在 9.78 分钟出现的未发生反应的 G - CSF 的较小

洗脱峰。

作为比较图 8 显示了用 MPEG 的 N - 羧琥珀酰脂所得的峰。其分子量也为 6kDa。从图可以看出，在反应混合物中有： tri - MPEG - GCSF 连接物（峰肩均在 7.25 分钟）， di - MPEG - GCSF 连接物（峰值在 7.62min）， mono - MPEG - GCSF 连接物（峰值在 9.87min）。

在 10 小时时间点， 92 % 的蛋白质已被转化成单个 PEG 化产品，其反应混合物的 pH 以 100mM HCl 调至 pH 4.0，并用 1mM HCl 将反应混合物稀释 5 倍。

mono - MPEG - GCSF 衍生物用离子交换色谱法合用以 20mM 的醋酸钠缓冲液 pH 为 4.0 平衡的 HiLoad 16/10 S Sepharose HP 柱（ Pharmacia ）进行纯化。反应混合物以 1ml/min 流速装柱，未反应的 MPEG 以 3 倍于柱体积的相同缓冲液进行洗脱。然后进行 400 分钟的线性梯度洗脱， 20mM 醋酸钠浓度从 0 % ~ 45 %， pH 4.0，内含 1M NaCl，在 4 °C 洗脱蛋白质 - 聚合物连接物。

将含 mono - MPEG - GCSF 衍生物的收集管合并，浓缩和过滤灭菌。

用不同平均分子量（ 12、 20 和 25kDa ）的 MPEG 醛修饰 rh - G - CSF 而得到的各种形式 mono - MPEG - GCSF 连接物以相似方法制备。

B. 单个 PEG 化 G - CSF 的分析

1. 分子量

利用 SDS - PAGE，凝胶过滤，基质辅助激光解析质谱分析（ matrix assisted laser desorption ），以及平衡离心法测定单个 PEG 化连接物的分子量。结果如下表 4 所示。

25

30

表 4

N - 末端烷基化 Mono - MPEG - GCSF 连接物分子量

| 连接物 | 估计的 分子量 | 凝胶过滤 测分子量 | 质谱测 分子量 | 超离心测 分子量 |
|---|------------|--------------|------------|-------------|
| 5 MPEG - (6kDa) - G - CSF MPEG - (12kDa) - | 24800 | 53024 | 24737 | 25548 |
| 10 GCSF MPEG - (20kDa) - GCSF MPEG - (25kDa) - GCSF | 30800 | 124343 | 30703 | 29711 |
| | 38800 | 221876 | 38577 | 38196 |
| 15 | 43800 | 333266 | N/D | N/D |

制备的 N - 末端 mono - MPEG - GCSF 连接物结构以 N - 末端蛋白质序列分析和肽酶切图谱法加以证实。N - 末端用硫氨酰残基的溴化氰裂解导致聚乙二醇分子的除去。

20 2. 生物活性

PEG 化 MPEG - GCSF 连接物的体外生物活性经过测定刺激鼠骨髓细胞对 ³H 胸腺嘧啶的吸收来测定。

25 体内生物活性经过将 MPEG - GCSF 连接物或 rhG - CSF (100mg/克体重剂量) 皮下注射仓鼠后测量其总白细胞数目来测定。与未修饰的 G - CSF 相比, PEG 化 G - CSF 生物活性的计算是以 WB/时间曲线下面积减去载体对照曲线下面积而得到的。MPEG - GCSF 衍生物的相对活性的表示是与其与未修饰的 G - CSF 相比的百分活性加以描述的。

30 如图 9 所示, 显示了对用不同分子量 (6kDa、12kDa 及 20kDa) 的 MPEG 醛经还原性烷基反应而制得的 mono - N - 末端 MPEG - GCSF 连接物的总白细胞数目反应。从图可以看出, 所有单个 PEG 化产物均诱导反应。除了 12kDa 的 PEG 在第二天白细胞数目较 20kDa PEG 产物作用后白细胞数目稍大外, 所用的聚乙二醇分子量越大, 获得的白细胞数目会越多。

3. 稳定性研究

比较了用两种不同的化学方法（这里指胺及酰胺的还原性烷基化反应）制备的 N - 末端 PEG 化 G - CSF 的聚合程度。出乎意料的是，发现以胺键形成的 N - 末端 PEG 化 G - CSF 要比以酰胺键（实施例 1 中所述的 NHS 法）形成的 N - 末端 PEG 化 G - CSF 稳定得多。

方法：两种形式的 N - 末端 PEG 化 G - CSF 产物置于 pH 4.0 的 10mM NaOAc 中，其中含 5 % 的山梨醇，蛋白质分子终浓度为每 ml 溶液中含 1mg 蛋白质。G - CSF 都用 PEG6000PEG 化。酰胺键连接物制备按实施例 1，胺键连接物制备按实施例 2 进行。每种形式的 6 等份样品在 45 °C 保存 8 周。8 周后，以分子筛层析及离子交换色谱测定聚集程度。

结果：结果表明本发明的还原性烷基化反应产物要比乙酰化产物优越得多，因为，令人吃惊的是，在升高的温度条件下产物经 8 周后，前者的聚集程度要比后者的要小得多。下表为两种形式产物经分子筛层析（SEC）或离子交换色谱（IE）分析后各自未发生聚集的百分数：

表 5

| 样本 45 °C 下 8 周 | % 主峰 SEC/IE |
|----------------|---------------|
| 胺键产物 | 82 % / 84 % |
| 酰胺键产物 | 37 % / 65 % * |

* 该值相对较高是因为离子交换色谱不能够进行聚集程度的彻底分析。

实施例 3

该实施例描述化学修饰的共有干扰素。更具体地说，该实施例描述了一种制备单个 PEG 化 IFN - con1 的基本上均一的群体的方法，及该群体的特征鉴定。

应该注意到，虽然本实施例中用的是 IFN - con1，但上述的任一共有干扰素均可被化学修饰。尽管本实施例中使用了聚乙二醇进行修饰，但象这种化学修饰可用上述任一水溶性聚合物进行。对于 PEG 化作用，虽然本实施例中使用的是 PEG12000，但其它任何形式的水溶性 PEG 均可使用（此处使用 PEG12000 是为了和易于处理和方便）。同样，这里也有很多种化学修饰方法（诸如乙酰化反应），但对于选择性 N - 末端化学修饰（如 N - 末端 PEG 化反应）来说，最好还是用该实施例中所述的还原性化反应。

A. 共有干扰素的制备

干扰素 IFN - α con1 (在这里指 IFN - con1 (可参见美国专利 No. 4, 695, 623 图 2 中的描述 (引用其全文以供参考) 它胜于制备单个 PEG 化共有干扰素。IFN - con1 是在细菌中表达外源性 DNA 而产生的, 其 N 5 - 末端具有一个甲硫氨酰残基。

B. 共有干扰素的 PEG 化

IFN - con1 溶液 (3.45mg/ml, 含 35.25 % 的 N - 末端封闭形式) 溶于磷酸钠浓度为 100mM, pH 4.0 内含 20mM NaCNBH₃ 的溶液中, 4 °C 冷却后充分混匀, 加入超出 8 倍摩尔量的甲氧聚乙二醇醛 (MPEG) (平均分子量为 12kDa)。 10

在反应过程中蛋白质的修饰程度用反相 HPLC 来监测, HPLC 以多聚 (苯乙烯/二乙烯基苯) 进行装柱, 如 PLRP - S (PL Separation Sciences Polymer Laboratories)。

10 小时后, 反相 HPLC 分析结果表明, 80 % 的 N - 末端具有未封闭的 α 氨基的蛋白质转变成 MPEG - IFN - con1 衍生物。 15

在 10 小时时间点, 反应混合物用水稀释 5 倍, mono - MPEG - IFN - con1 衍生物的纯化用离子交换层析来完成, 其所用的柱为 Hiload 16/10 S Sepharose HP 柱 (Pharmacia), 以 20mM 的醋酸钠缓冲液 pH 4.0 加以平衡。反应混合物以 1ml/min 的流速装入柱内, 未反应的 MPEG 20 醛以 3 倍于柱体积的相同缓冲液加以洗脱。然后在 4 °C 条件下进行蛋白质 - 聚合物连接物分子的洗脱, 以 0 % - 75 % 的 20mM 醋酸钠缓冲液进行线性洗脱 420 分钟。缓冲液 pH 为 4.0, 含有 1M NaCl。

合并含 mono - MPEG - IFN - con1 衍生物的馏分, 经浓缩后再过滤灭菌。 25

C. 单个 PEG 化共有干扰素的分析

1. 均一性

纯化的 mono - MPEG - IFN - con1 连接物均一性通过 SDS - PAGE 加以检测, SDS - PAGE 用的是 10 - 20 % 或 4 - 20 % 的预制梯度胶 (Integrated Separation System)。凝胶显示主要带在分子量为 30 35kDa 处。

各种形式 mono - MPEG - IFN - con1 的有效半径 (流体动力学半径) 测定用的是 Superose 6HR 10/30 (Pharmacia) 凝胶过滤柱。在 280nm

处经紫外吸收测定蛋白质。BIO - RAD 凝胶过滤标准品作为球状蛋白质分子量标记。

纯化的 N - 末端 mono - MPEG - IFN - con1 连接物结构采用 N - 末端蛋白质测序及肽酶切图谱来加以证实。

5 在这里必须注意该 IFN - con1 制品中含有一些 N - 末端封闭物质，它们未发生 PEG 化。然而，PEG 化的物质均为 N - 末端单个 PEG 化。因而，在这种情况下，可考虑能用其它方法将末端封闭和未封闭的产物分开，如用离子交换层析或分子筛分析法。

2. 生物活性

10 mono - MPEG - IFN con1 连接物体外生物活性是经过测定其抗病毒活性来测定的。mono - MPEG - IFN con1 连接物的体外生物活性经过测定其在人 (Hela) 细胞中的抗病毒生物活性来确定。

15 发现 mono - MPEG (12kDa) - IFN - con1 连接物体外生物活性 (U/mg 蛋白质为未修饰 IFN - con1 活性的 20%。正如前面所述的 PEG 化 G - CSF，体外分析虽然对了解生物活性有一定作用，但由于特征性缓慢释放，常测得的化学修饰蛋白质活性很低。体内生物活性要比体外高。

D. N - 末端封闭分子去除后化学修饰的共有干扰素。

20 前面所述的 IFN - con1 经预先去除其中的 N - 末端封闭分子部分之后，也进行本发明的还原性烷基化反应。在上面所述的还原性烷基化反应。在上面所述的还原性烷基化方法中使用了 PEG12000 和 PEG20000 两种分子。

该分子的表观分子量如下

| 连接物 | 凝胶过滤测得的 表观分子量 | SDS - PAG 测得 的表观分子量 |
|-----------------------------------|------------------|------------------------|
| 25 monoMPEG (12kDa) IFN - con1 | 104.0kDa | 35.6kDa |
| monoMPEG (20kDa) IFN - con1 | 175.1kDa | 55.4kDa |

30 IFN - con1 20kDa PEG 连接物的 FPLC 离子交换色谱分析结果中出现 3 个峰：

MonomPEG - IFN - con1：占总面积的 66% (洗脱至 265.93ml)。

蛋白质聚集物 (aggregate) 及寡聚 MPEG - IFN - con1 连接物:
占总面积的 24 % (洗脱至 238.42ml) 以及

未反应的 IFN - con1: 占 10 % 的总面积 (洗脱至 328.77ml) 。

5 该条件尚未进一步优化, 可用色谱或其它方法进一步分离单个 PEG
化的物质。

尽管用优选的实施例描述了本发明, 但应明白对于本领域的技术人员而言可进行变动和修改。因此, 在所附的权利要求书中试图覆盖所有落在所要求的本发明范围内的等价变化。

10

15

20

25

30

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人: AMGEN INC

(ii) 发明题目: N - 末端化学修饰的蛋白质组合物及方法。

5 (iii) 序列个数: 2

(iv) 联系地址:

(A) 地址: Amgen Inc.

(B) 街道: 1840 Dehavilland Drive

(C) 城市: Thousand Oaks

10 (D) 州: California

(E) 国家: USA

(F) 邮政区号: 91320

(v) 计算机可读形式:

(A) 贮存介质: 软磁盘

15 (B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0 , #1.25. 版

(vi) 当前的申请资料:

(A) 申请号码:

20 (B) 申请日:

(C) 分类:

(viii) 代理人/代理信息:

(A) 姓名: Pessin, Karol M.

(B) 参考/摘要号: A - 286

25 (2) SEQ ID NO : 1 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 531 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

30 (D) 拓扑学特征: 线形

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 1 :

ATGACTCCAT TAGGTCCCTGC TTCTTCTCTG CCGCAAAGCT TTCTGCTGAA ATGTCTGGAA 60
 CAGGTTCGTA AAATCCAGGG TGACGGTGCT GCACTGCAAG AAAAAGTGTG CGCTACTTAC 120
 AAAGTGTGCC ATCCGGAAGA GCTGGTACTG CTGGGTCATT CTCTTGGGAT CCCGTGGGCT 180
 5 CCGCTGTCTT CTTGTCCATC TCAAGCTCTT CAGCTGGCTG GTTGTCTGTC TCAACTGCAT 240
 TCTGGTCTGT TCCTGTATCA GGGTCTTCTG CAAGCTCTGG AAGGTATCTC TCCGGAAGT 300
 GGTCCGACTC TGGACACTCT GCAGCTAGAT GTAGCTGACT TTGCTACTAC TATTTGGCAA 360
 CAGATGGAAG AGCTCGGTAT GGCACCAGCT CTGCAACCGA CTCAGGTGC TATGCCGGCA 420
 TTCGCTTCTG CATTCCAGCG TCGTGCAGGA GGTGTACTGG TTGCTTCTCA TCTGCAATCT 480
 10 TTCCTGGAAG TATCTTACCG TGTTCTGCGT CATCTGGCTC AGCCGTAATA G 531

(2) SEQ ID NO : 2 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 175 氨基酸

15 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学特征: 线形

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 2 :

20 Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30
 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 35 40 45
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 50 55 60
 Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
 65 70 75 80
 Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

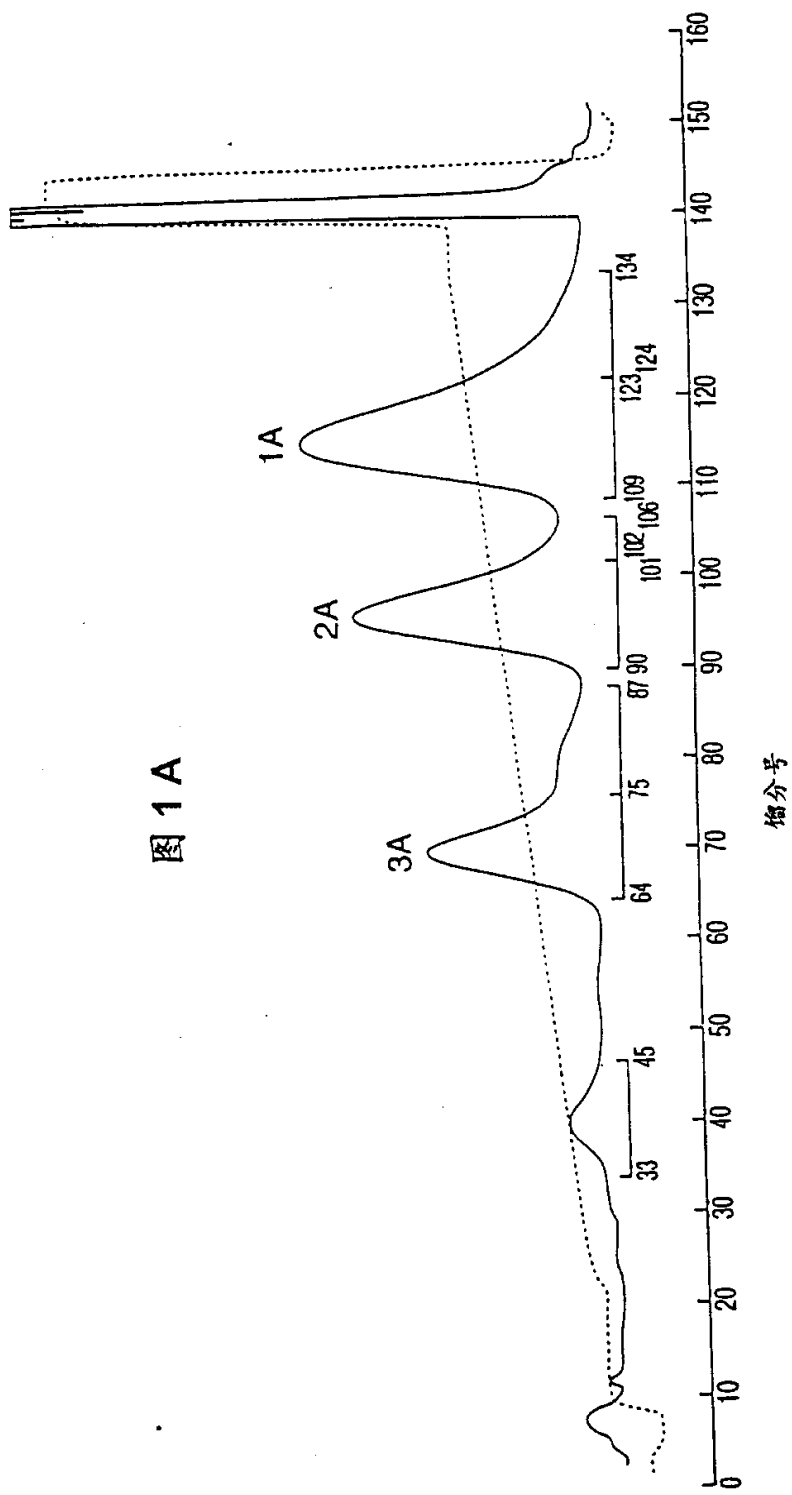
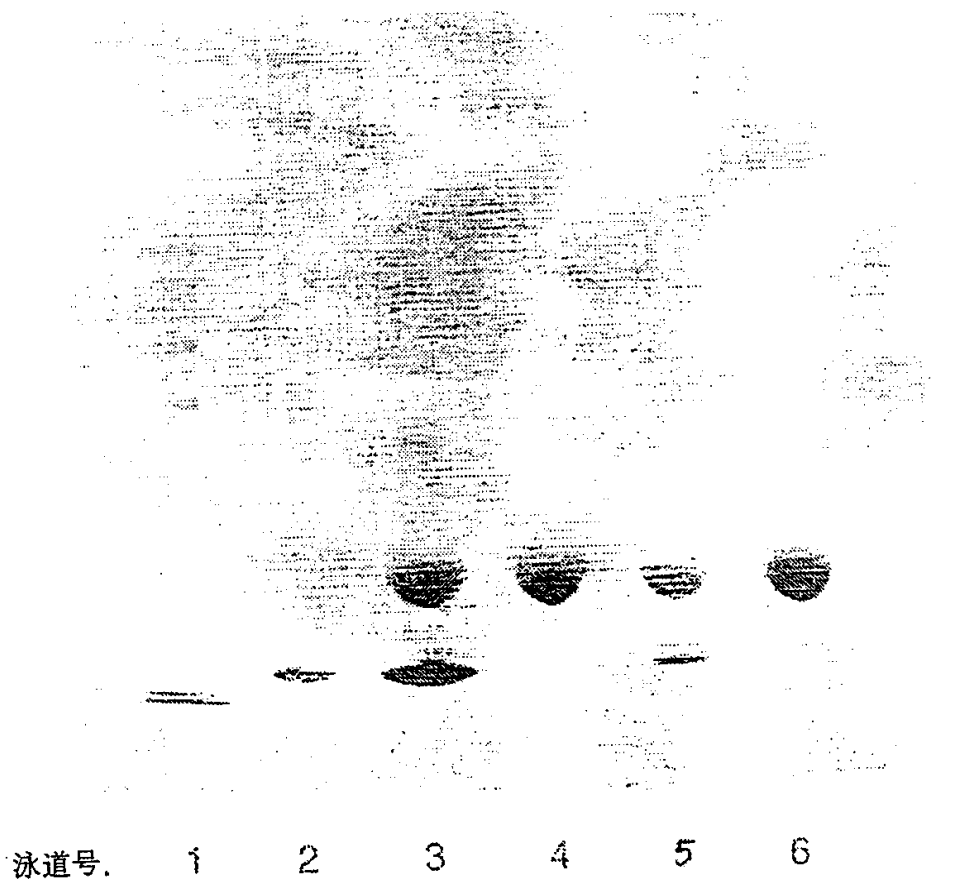


图 1A

图 1 B



| 泳道号 | 样品 | 加入(样品的)微克数 |
|-----|--------------------|------------|
| 1 | MW 蛋白质标准品 | - |
| 2 | rHuG-CSF 分子量 | 3.0 |
| 3 | SCM-PEG-GCSF 反应混和物 | 10.0 |
| 4 | 形式 1 (N-Term) | 10.0 |
| 5 | 形式 2 (Lys-35) | 10.0 |
| 6 | 形式 3 (Lys-41) | 10.0 |

图 2

SEC-HPLC 图

- (A) rHuG-CSF 标准样
- (B) SCM-PEG-GCSF 反应混和物
- (C) 形式 1 (N- 末端衍生物)
- (D) 形式 2 (Lys-35 衍生物)
- (E) 形式 3 (Lys-41 衍生物)

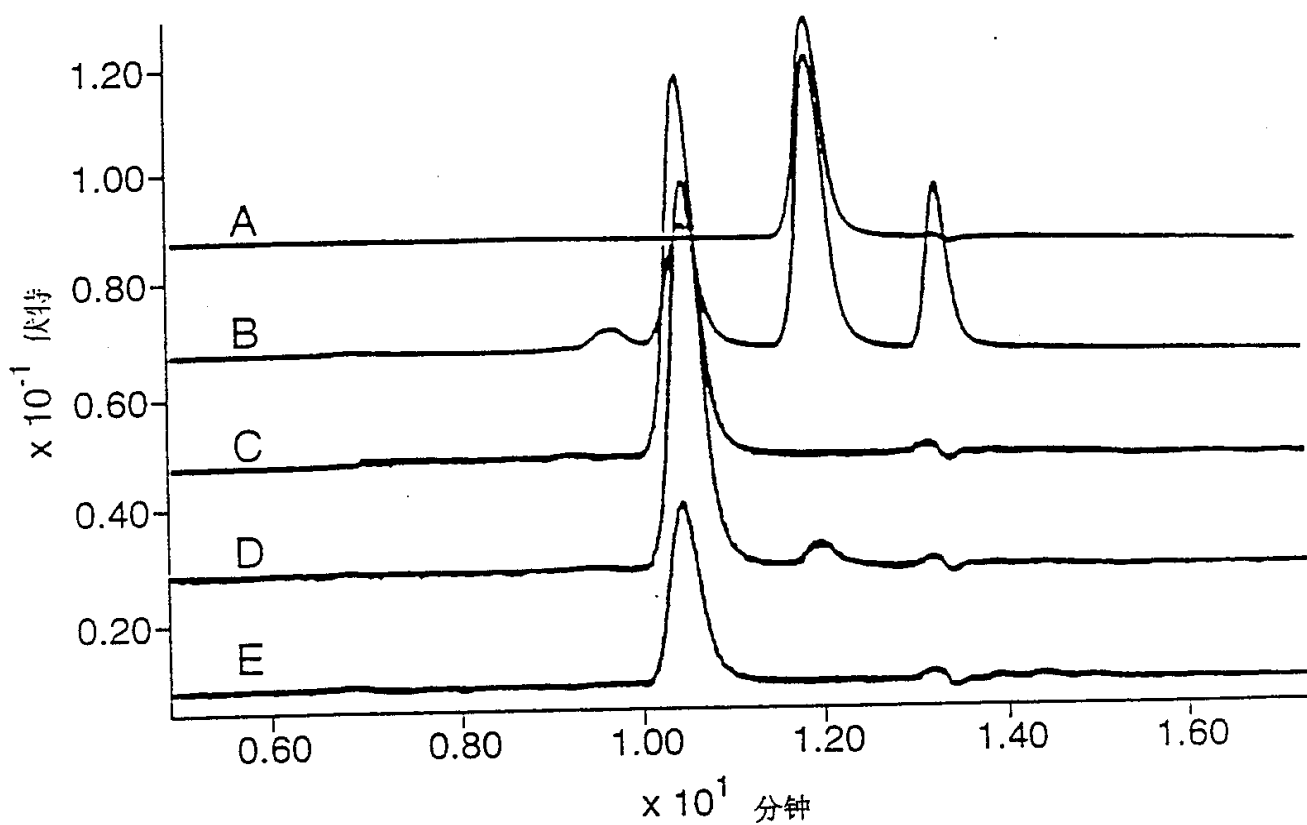


图 3 A

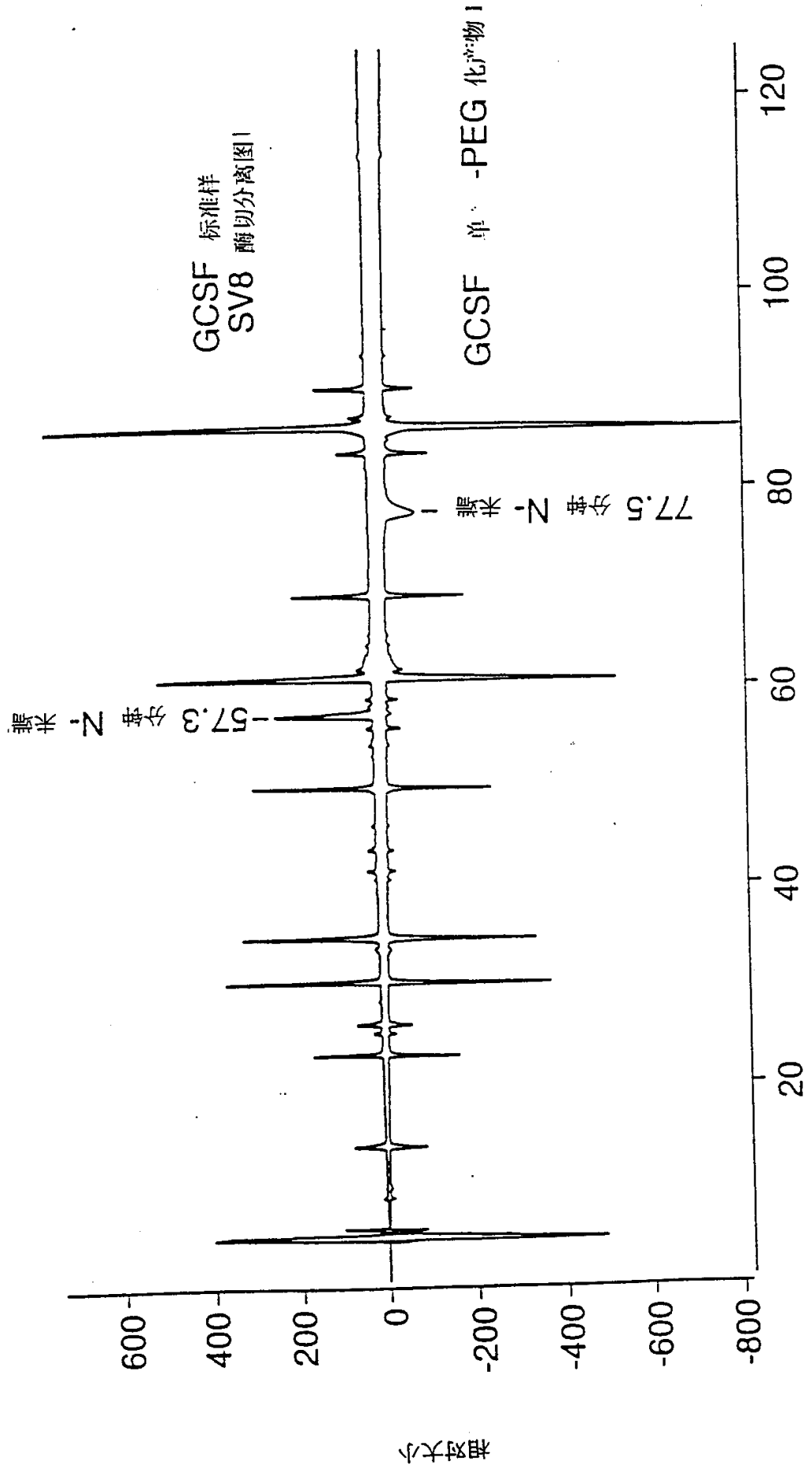


图 3 B

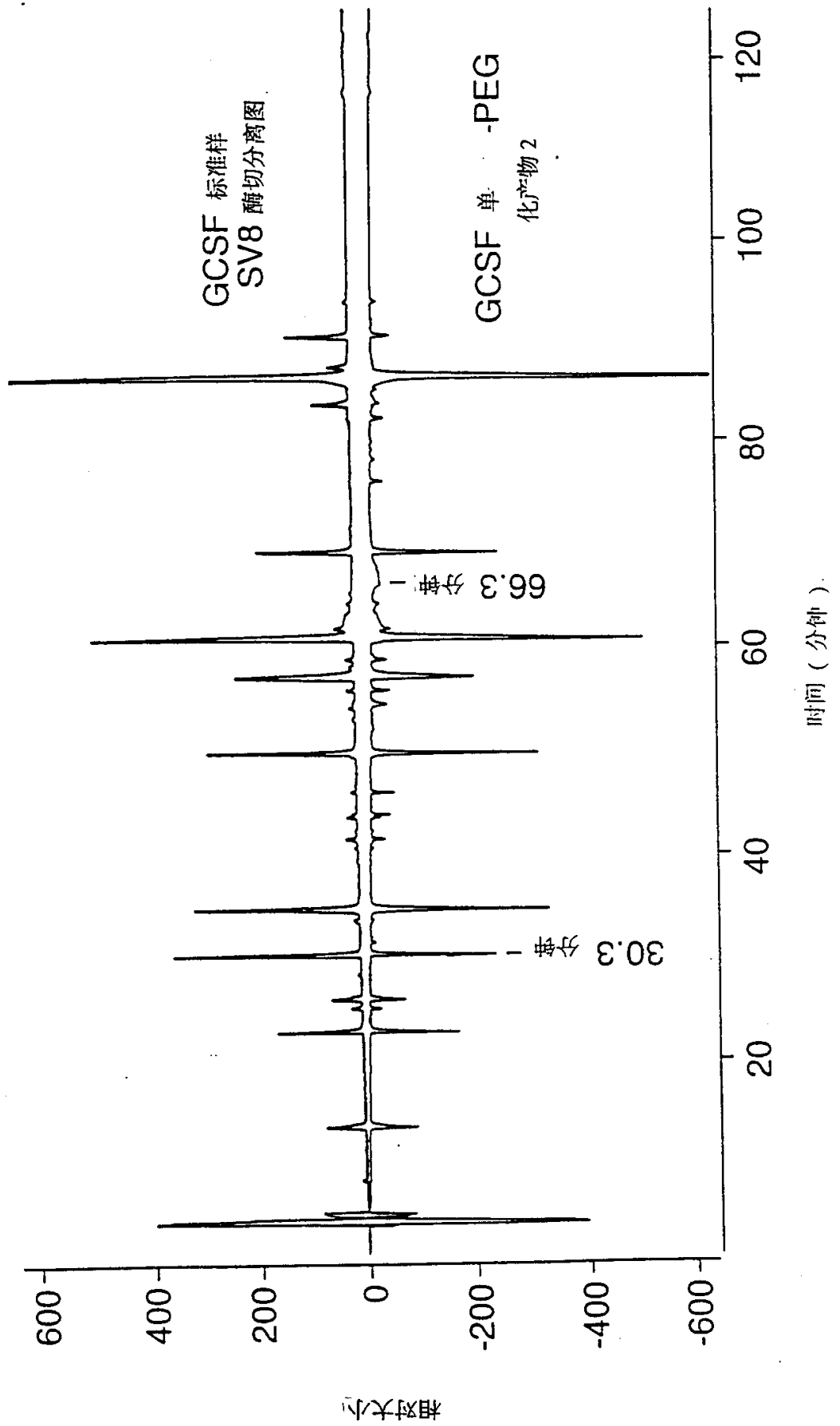


图 3C

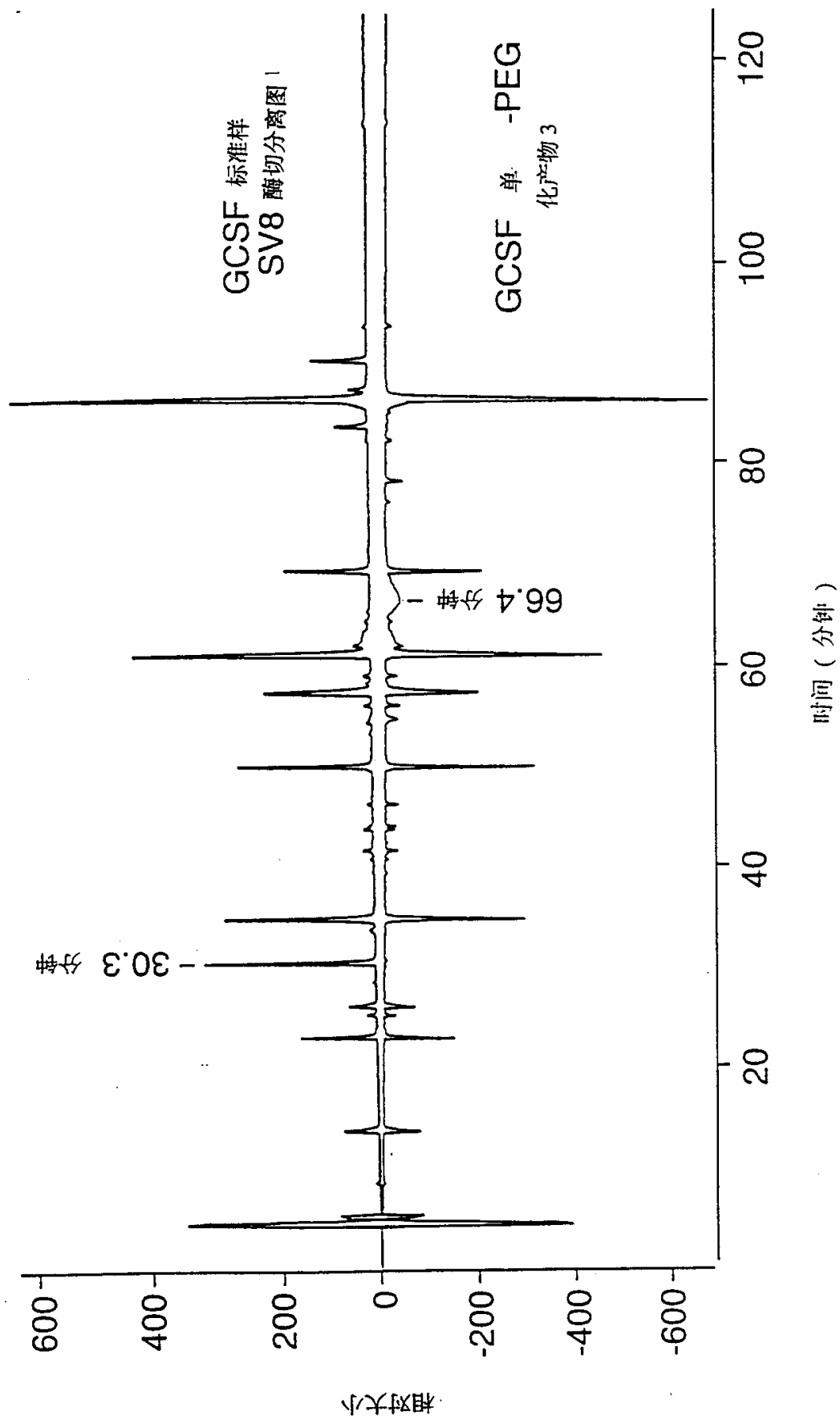
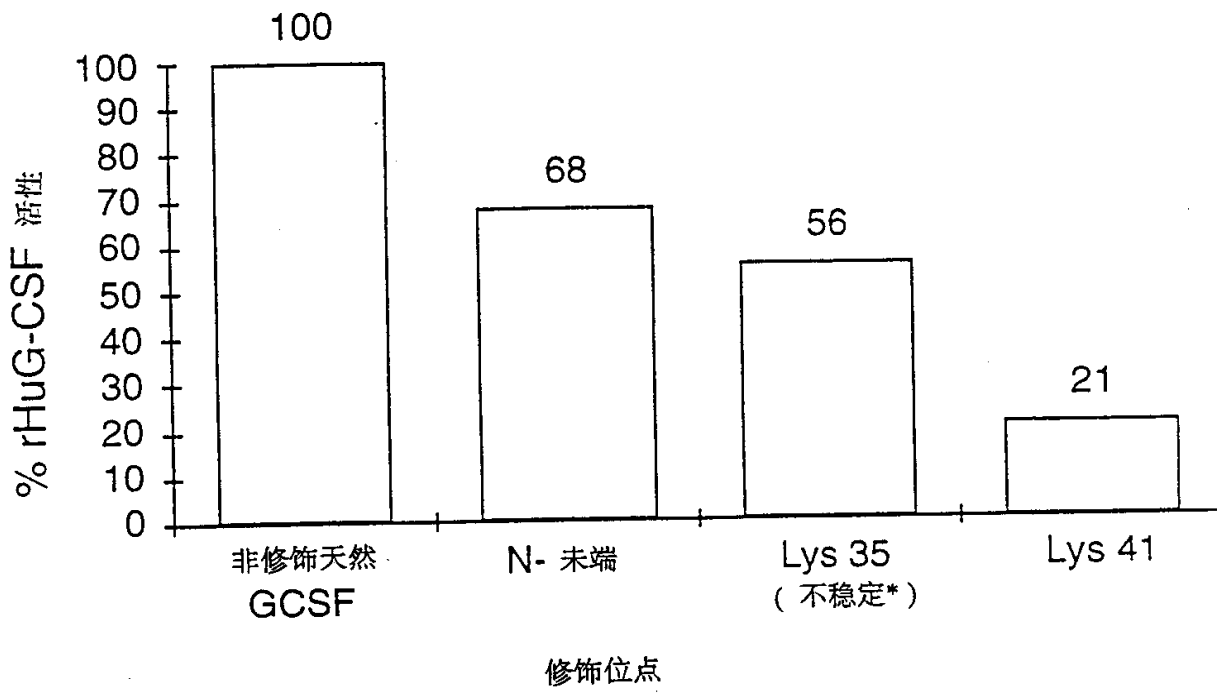


图 4



* 其中含贮存过程中脱-PEG 化的 rHuG - CSF

图 5 A

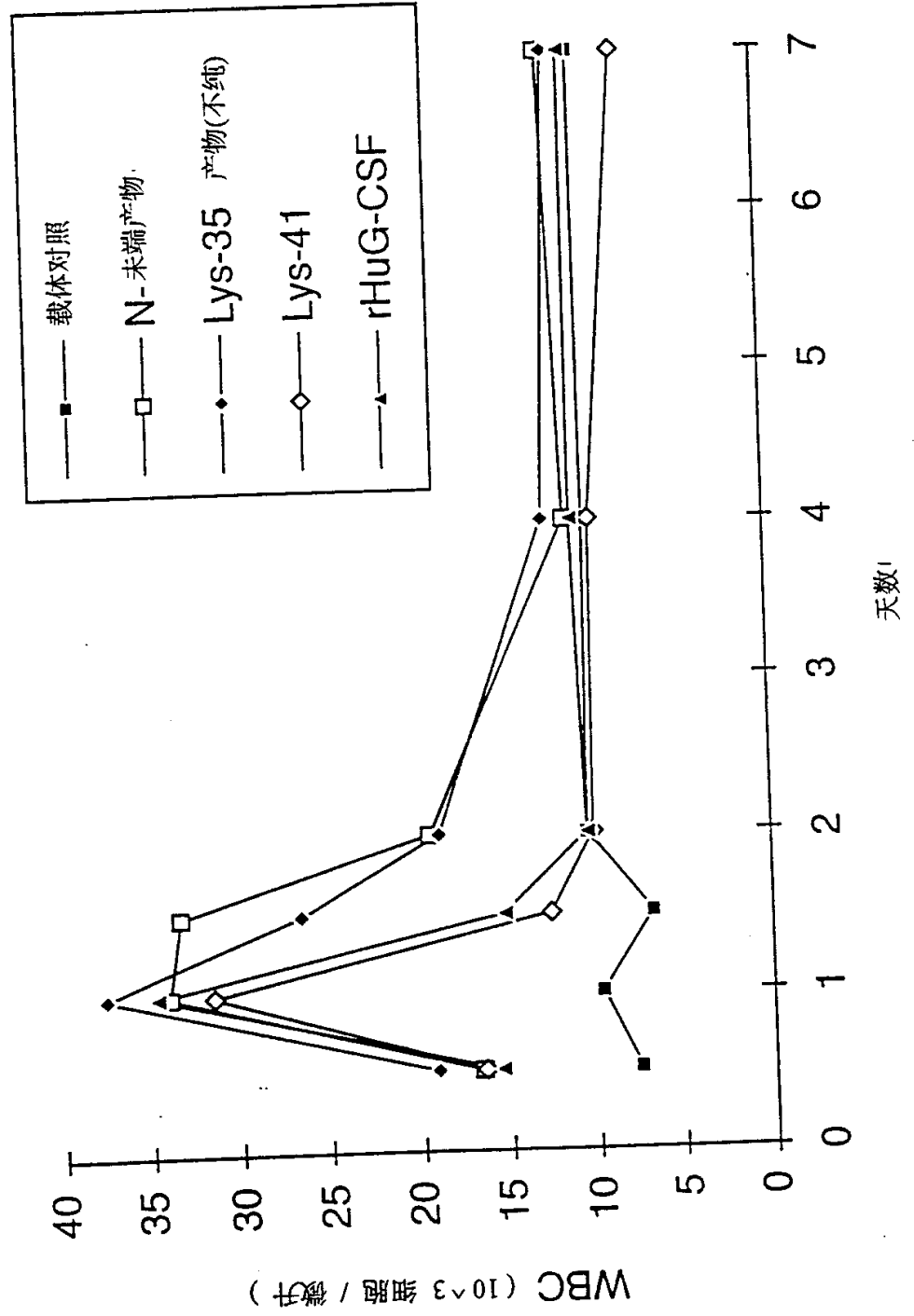


图 5B

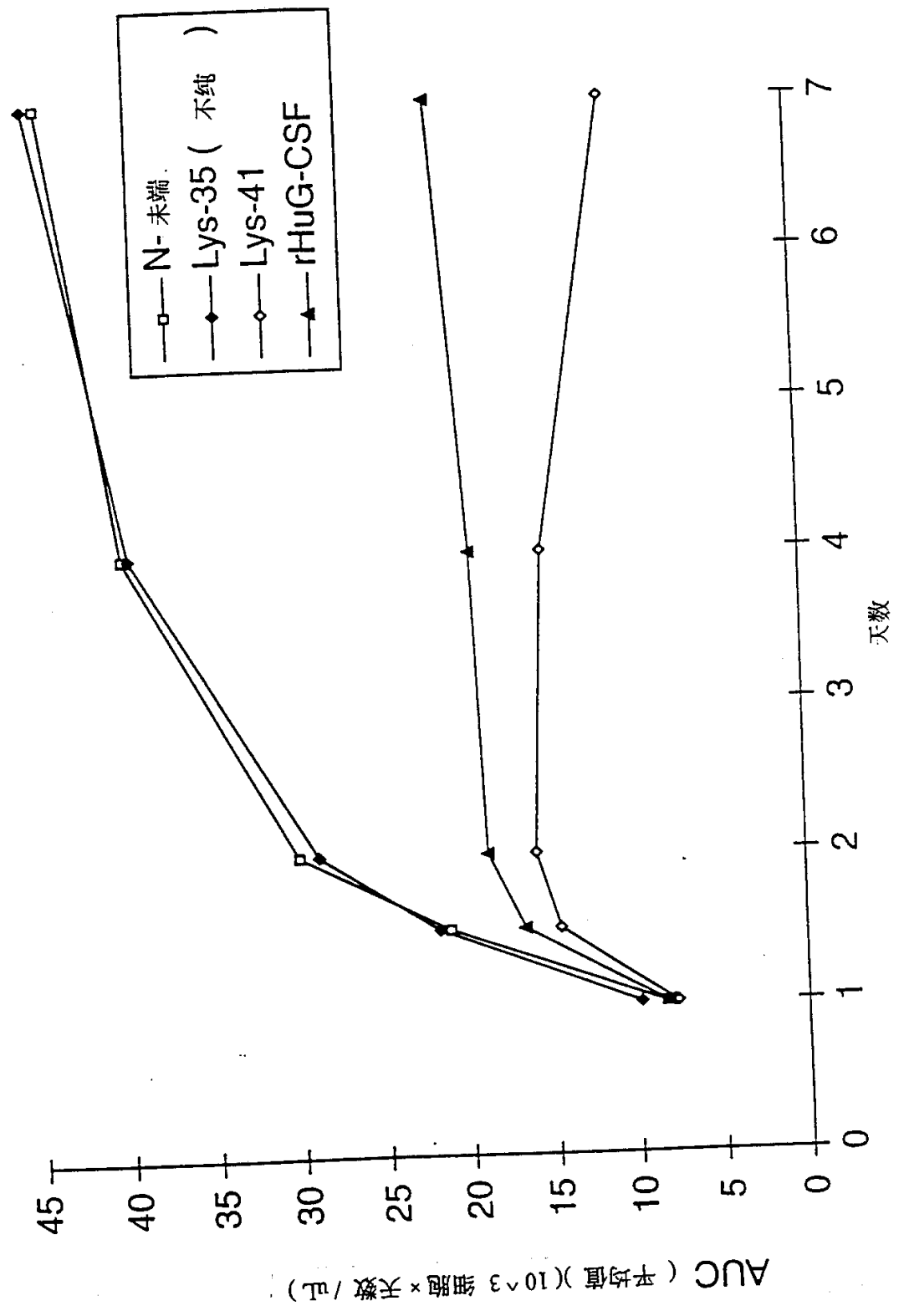


图 6 A

N- 末端单 PEG 化 G-CSF, pH6.0

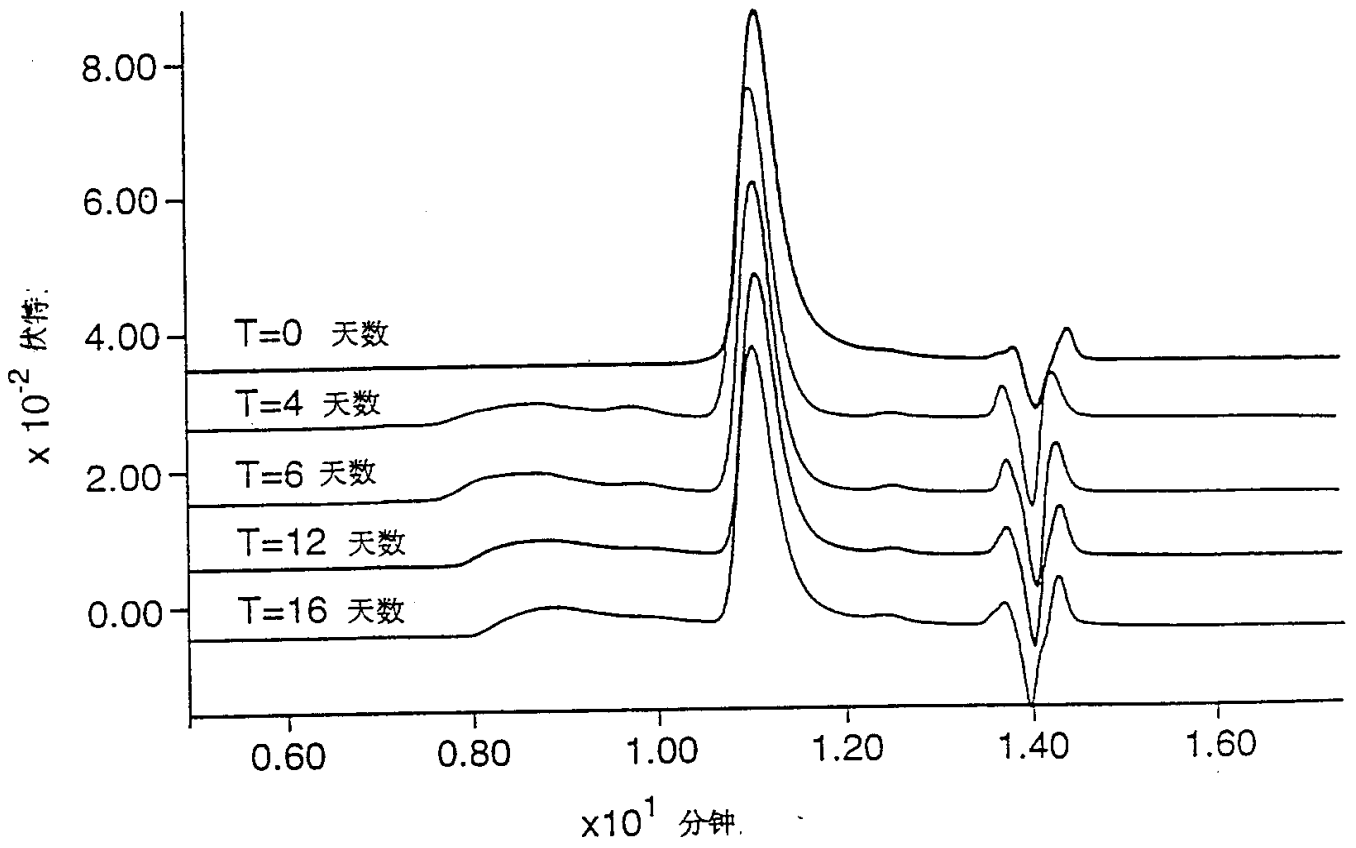


图 6 B

Lys 35 单 PEG 化 G-CSF, pH6.0

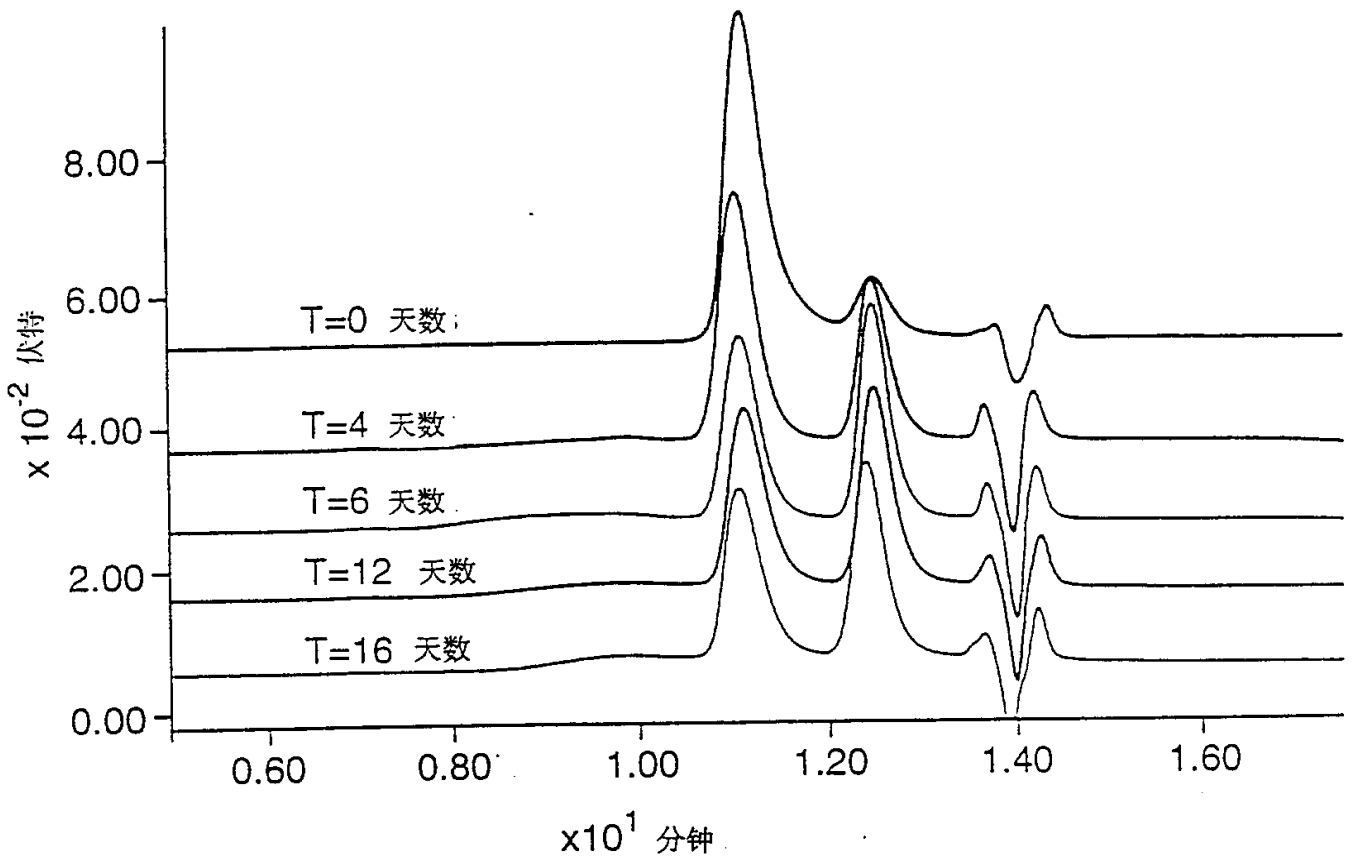


图 6C

Lys 35 单 PEG 化 G-CSF, pH7.0 分钟

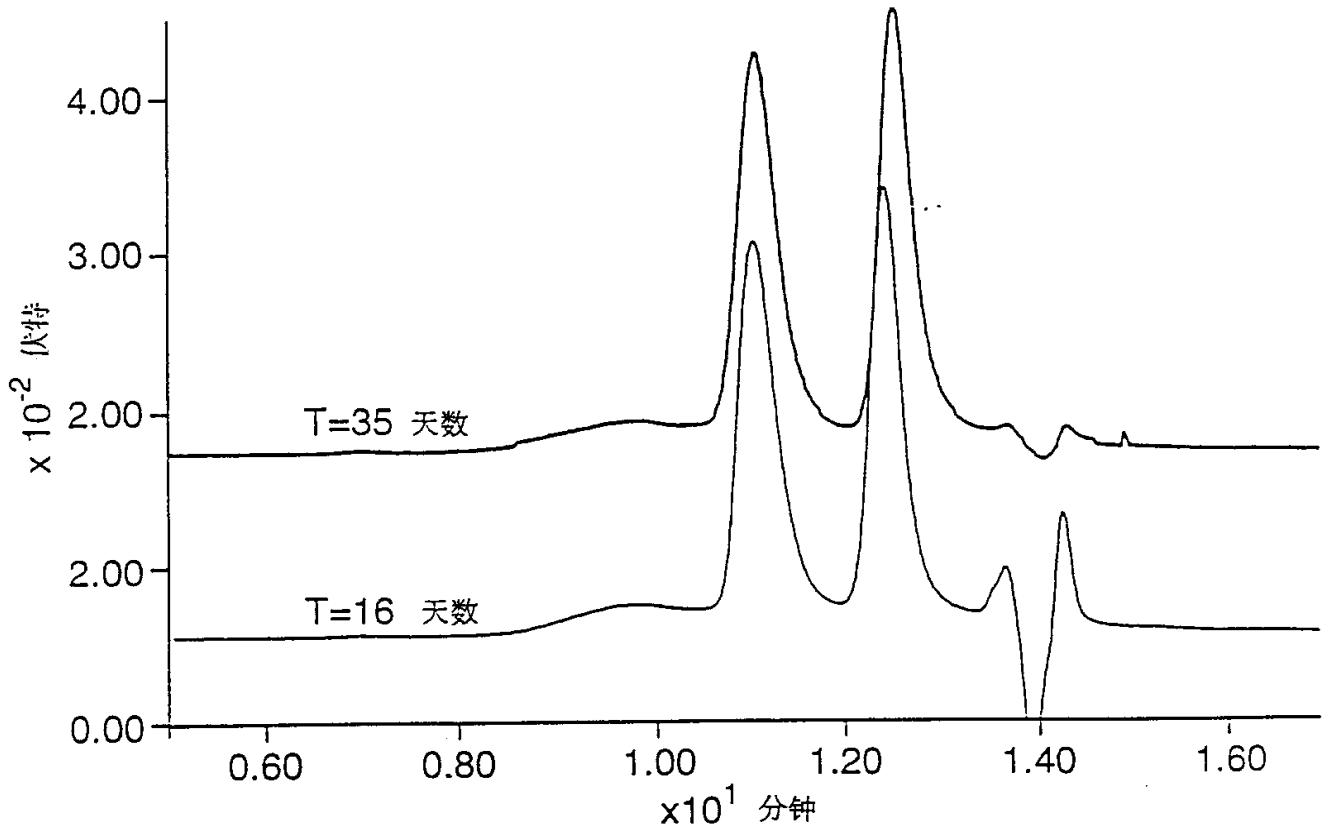


图 7

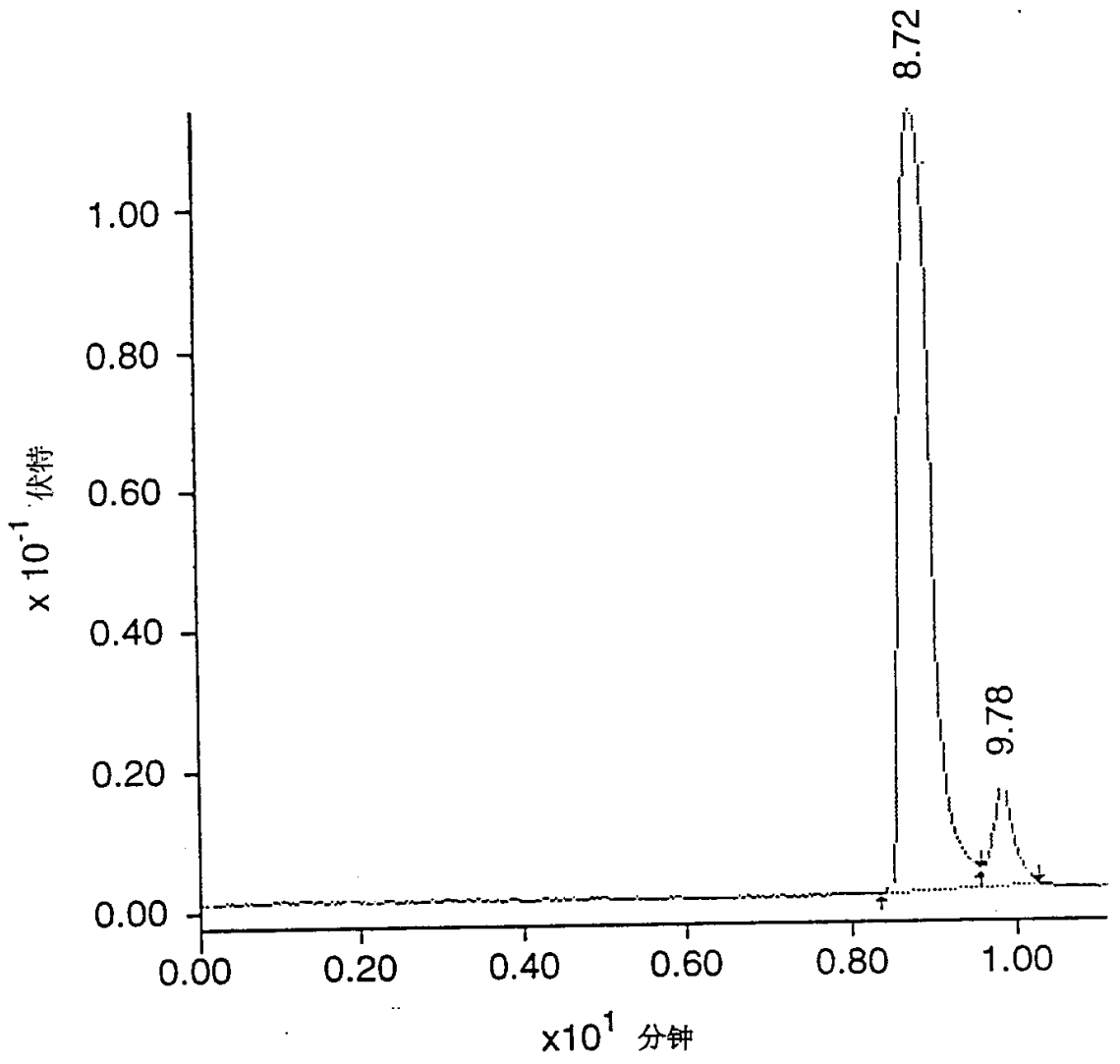


图 8

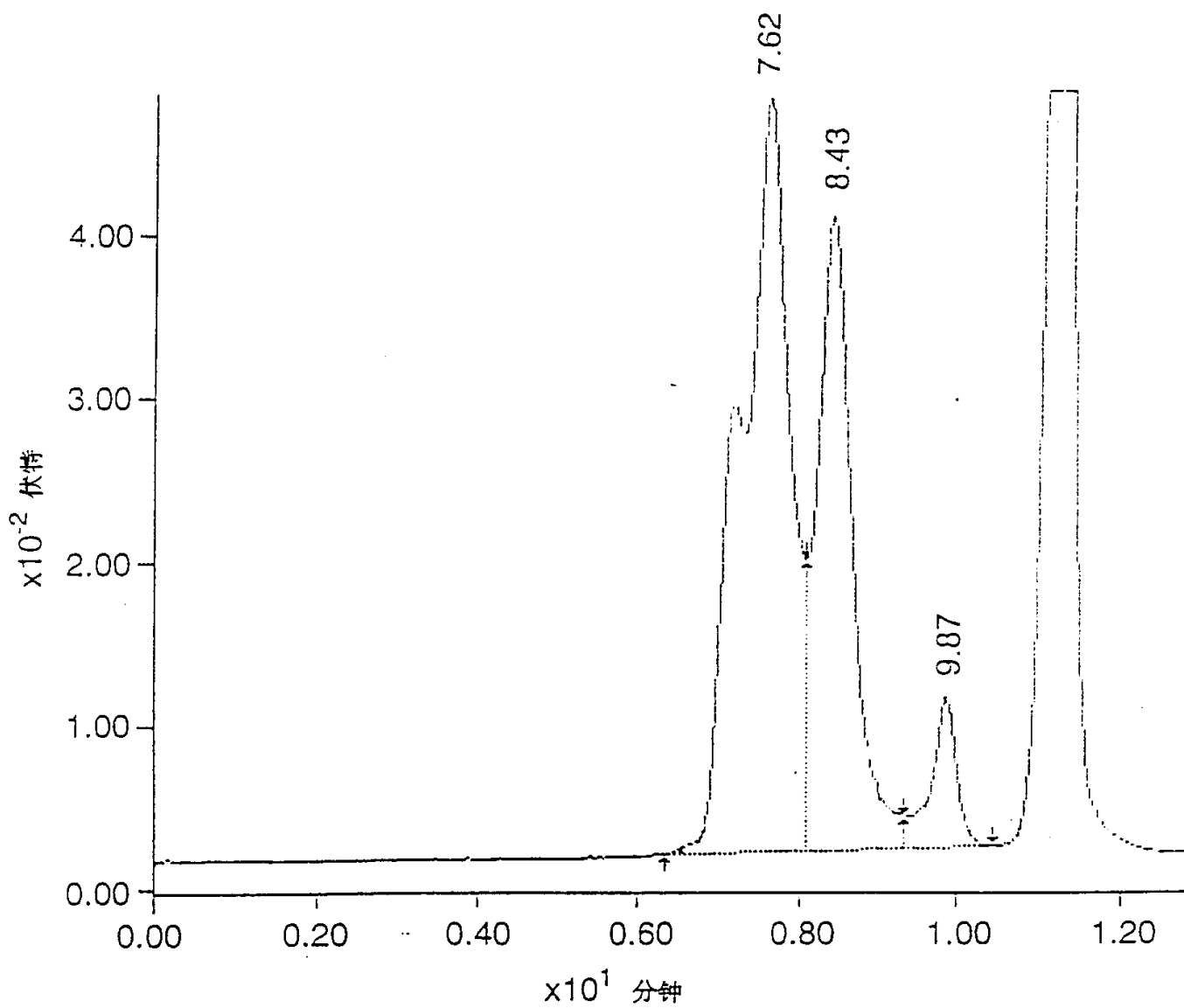


图 9

